

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
SAÚDE

ELVIS WISNIEWSKI

EFEITOS METABÓLICOS E MOLECULARES DA
EXPOSIÇÃO À FUMAÇA DE CIGARRO NO TECIDO ADIPOSEO
DE CAMUNDONGOS MAGROS E OBESOS: PERSPECTIVAS
NO CONTROLE DO PESO CORPORAL

CRICIÚMA, AGOSTO DE 2016

ELVIS WISNIEWSKI

**EFEITOS METABÓLICOS E MOLECULARES DA
EXPOSIÇÃO À FUMAÇA DE CIGARRO NO TECIDO ADIPOSEO
DE CAMUNDONGOS MAGROS E OBESOS: PERSPECTIVAS
NO CONTROLE DO PESO CORPORAL**

Tese de doutorado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde como parte
dos requisitos para a obtenção do
título de Doutor em Ciências da
Saúde

Orientador: Prof. Dr. Cláudio
Teodoro de Souza.

CRICIÚMA, AGOSTO DE 2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

W815e Wisniewski, Elvis.

Efeitos metabólicos e moleculares da exposição à fumaça de cigarro no tecido adiposo de camundongos magros e obesos: perspectivas no controle do peso corporal / Elvis Wisniewski ; orientador: Claudio Teodoro de Souza, – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2016.

107 p: il. ; 21 cm.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul
Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde, Criciúma, SC, 2016.

1. Obesidade. 2. Adiposidade corporal. 3. Nicotina –
Metabolismo. 4. Metabolismo energético. 5. Lipólise. I.
Título.

CDD. 22^a ed. 616.398



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão

Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)

Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

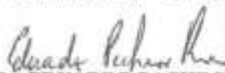
PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO apresentada pelo candidato **Elvis Wisniewski** sob o título **“Efeitos metabólicos e moleculares da exposição à fumaça de cigarro no tecido adiposo de camundongos magros e obesos: perspectivas no controle do peso corporal”**, para obtenção do grau de **DOUTOR EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e arguido o candidato, os membros são de parecer pela **“APROVAÇÃO”** da Tese.


Criciúma, SC, 30 de agosto de 2016.



Prof. Dr. RICARDO AURINO DE PINHO
Membro Relator – UNESC


Prof. Dr. EDUARDO PACHECO RICO
Membro Interno – UNESC


Prof. Dr. SAMUEL DOS SANTOS VALENÇA
Membro Externo – UFRJ


Prof. Dr. ANTONIO GALINA FILHO
Membro Externo – UFRJ


Prof. Dr. Claudio Teodoro de Souza
Orientador


Prof. Dr. Claudio Teodoro de Souza
Coordenador do PPGCS

FOLHA INFORMATIVA

A tese foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

Dedico este trabalho à minha
esposa Miriam, com quem compartilho os momentos mais
difíceis, mas principalmente os momentos de felicidade.
Obrigado pelo apoio.

AGRADECIMENTOS

Chegado o momento mais difícil deste trabalho, mas à tempo, o mais importante e verdadeiro, o momento de agradecer, lembrar, compartilhar com todos, os inúmeros, incontáveis momentos ou passagens desta trajetória de mais de quatro anos. Difícil, pois nem mesmo os 95% utilizados na estatística poderiam apontar para a real “significância” de todas as pessoas que fizeram parte desta caminhada, que talvez não por um ato intencional, mas simplesmente por um ato falho, alguns que, mesmo não constantes nesta página, certamente terão um espaço neural, marcado pela “sinalização celular” e pela “bioquímica” na minha memória, aos quais igualmente serei eternamente grato.

Preciso expressar o maior dos agradecimentos ao meu orientador Prof. Dr. Claudio Teodoro de Souza, por todo apoio a mim dispensado, pelo domínio do conhecimento científico, a minha admiração e reconhecimento, pelas palavras de boas-vindas a cada chegada em Criciúma, bem como as palavras de otimismo durante as estadas no LAFIBE; pela rapidez em responder aos meus questionamentos. Quando o e-mail era enviado, nem mesmo passados cinco minutos, era só abrir a caixa de mensagens e lá estava a resposta, em raras vezes apenas para informar que havia recebido a mensagem e assim que possível responderia com mais detalhes; tenho o maior orgulho de ter sido orientado pelo “Professor Claudio” ao qual desta forma sempre me dirigi, por uma questão de respeito,

sabendo que poderia simplesmente chamar de Claudio, pois tamanha é a sua simplicidade e humildade, mais uma vez e para sempre meu muitíssimo obrigado.

Agradeço da mesma forma ao “exército” do Lafibe, coordenado pelo professor Claudio. Todos, irrestritamente foram fundamentais para que este trabalho, nascesse, crescesse e frutificasse. Quantos Blots, revelações, acompanhadas de angústias no momento das revelações: “ficou bom, não ficou”; e o dia das coletas dos materiais dos camundongos, sempre muito organizadas, com a segurança, cuidado, zelo, que bela equipe. Certamente qualquer laboratório do mundo gostaria de tê-los como atores, não como coadjuvantes, mas atores do elenco principal; inicialmente agradeço ao “pelotão” mais experiente: Thaís, Schérolin, Daniela, Bruno, na sequência aos “um pouco” mais novos como o Vitor, a Hemelin, Lara, Matheus, Marcelo, e Alessandra, Gabriela, bem como àqueles que tomaram outro caminho.

Não há dicionário no mundo que contenha as palavras que poderiam externar o meu agradecimento à minha esposa Miriam, pelo amor, encorajamento e compreensão, que tanto me ajudou nesta caminhada. Me considero uma pessoa abençoada por Deus, pois tive a felicidade de encontrar a companheira perfeita tão cedo, numa fase da vida que marcou a minha pessoa para sempre, o período de estudos na Polônia. O destino foi tão perfeito que mesmo sendo do mesmo estado, a oportunidade de nos colocar um ao lado do outro foi fora do país, no período da graduação, no país de origem dos nossos avós e bisavós. Por

isso eu acredito no destino. Pelo fato de me anteceder na defesa de sua tese de doutorado, me guiou por um caminho mais tranquilo.

À toda minha família, em especial à minha mãe e ao meu pai (que certamente guiou meus passos lá de cima) pelos ensinamentos de vida; aos meus irmãos Elton, Edison e Edio, dos quais tenho muito orgulho, por também lutar pelos seus sonhos, mesmo que por tão cedo em suas vidas não puderam contar com um dos pilares de sustentação familiar. A todos os tios, primos e amigos (amigos do futebol da sexta-feira) que sempre manifestaram interesse e preocupação, ansiedade quanto ao andamento dos estudos.

Aos meus “pais” Mariano e Antonina por nos servirem não apenas com seu apoio afetivo, por nos preparar o café, o almoço, o jantar, os lanches quando estávamos diante do computador, mas também pelas orações para que esta caminhada fosse mais leve; pobre “Santo Antônio”. Ao “Julinho”, “Mariazinha”, “Deco”, “Angi” e a Dona Rosa que em suas orações nos faziam ser lembrados. De igual medida agradecer ao Carlos, Audrey e ao Marco Antônio, por nos dar guarida durante estes quase cinco anos. Por nos aguardar e receber em sua casa em Criciúma, sempre com um forte abraço, um abraço regenerativo, bem como pelo momento de descontração na hora do jantar, antecedido por aquela cervejinha gelada, que é marca registrada do “Mano”.

Aos amigos do “tur” Erechim – Criciúma - Criciúma – Erechim: Ana Lúcia, Fernanda, Irany, Janesca, Mari, Wolnei, que

aliviaram as tensões e angústias pelo fato de compartilhar praticamente as mesmas preocupações. Obrigado pela companhia nas viagens, nos lanches de Vacaria, na parada obrigatória em Tainhas, quanto desabafo e risos.

Aos amigos e colegas de trabalho da URI Erechim, destacando a amizade e o companheirismo do Álvaro, do professor Chicota, professora Silvane, da Vanessa, da Cidiane, Janaíne, bem como ao Dechristian, que igualmente estando na caminhada do seu doutorado me auxiliou com o envio de artigos, os quais eu não tinha acesso, obrigado. Do mesmo modo agradeço imensamente pelo apoio da direção acadêmica, geral e financeira da URI, a qual dispensou o suporte de materiais e infraestrutura para realização de algumas das etapas do trabalho, bem como pelo apoio financeiro, pela ajuda de custo. Um sinal claro de que Universidade da qual faço parte tem uma preocupação no aperfeiçoamento do seu quadro funcional.

Ao final, com o mesmo peso, agradeço e parablenizo a UNESCO, de maneira muito especial ao programa de pós-graduação em ciências da saúde, pelo elevado nível organizacional, intelectual, o que vem sendo denotado com um alto padrão dos seus trabalhos, principalmente pelas suas publicações de artigos de nível internacional, o que põe a UNESCO em destaque nacional e porque não dizer a nível internacional. Obrigado à secretaria do PPGCS pela atenção e carinho dispensados. Estou muito feliz por ter escolhido esta Universidade e por ela fazer parte da minha formação acadêmica.

Aqueles não lembrados ou não citados me perdoem a injustiça do esquecimento.

O resultado final destes quase cinco anos, não serão apenas os resultados percorridos em gráficos nesta tese, mas a principal marca desta caminhada é a amizade que nasceu e há de permanecer para sempre. A conclusão final é que valeu muitíssimo à pena. Obrigado à todos.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

RESUMO

A obesidade *per se* induz marcantes alterações metabólicas e moleculares que são maléficas ao organismo e podem resultar em graves problemas de saúde, acarretando alta prevalência de morbidade e mortalidade, causando elevados custos financeiros ao sistema de saúde pública. Além do estilo de vida sedentário, é crescente o número de indivíduos obesos e fumantes no Brasil e no mundo. O estresse oxidativo induzido pela fumaça de cigarro é uma situação vivenciada pelo ser humano e ainda é potencializado em indivíduos obesos. Por outro lado, a fumaça de cigarro parece modular importantes enzimas da cascata lipolítica. Hábitos alimentares inadequados e o uso do tabaco aumentam a produção de espécies reativas, mas não está claro como esses processos podem modular o controle do peso, em especial a massa gorda. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar as alterações metabólicas, moleculares e de adiposidade induzidos pela exposição à fumaça de cigarro. Os experimentos foram divididos em quatro etapas. Na primeira etapa, camundongos *Swiss* magros foram expostos à 4 cigarros comerciais com filtro (alcatrão 10mg; nicotina 0,8mg; monóxido de carbono 10mg) por sessão, 3 sessões/dia, todos os dias da semana por 7D, 15D, 30D, 45D e 60D dias (n=10) e grupo controle - CNT (sem exposição). A partir dos resultados da etapa 1, optou-se pelo uso do grupo 45 dias nas etapas seguintes. Assim, numa segunda etapa, os grupos de camundongos foram divididos em 4 grupos: CNT- controle não exposto; CNT+NAC - controle não exposto suplementado com NAC; 45FC - exposto à fumaça de cigarro por 45 dias; 45NAC - exposto à fumaça de cigarro suplementado com NAC por 45 dias. A dose de NAC foi de 60mg/kg/dia. A terceira etapa consistiu da cessação à fumaça de cigarro. Os camundongos foram divididos em 6 grupos: CNT - controle não exposto; FC45 - exposto à fumaça de cigarro por 45 dias e na cessação por 7D, 15D, 30D e 45 dias. Na quarta etapa, camundongos *Swiss* obesos foram expostos à fumaça de cigarro, suplementados com NAC e submetidos a cessação, distribuídos nos seguintes grupos: DP – alimentados com dieta padrão por 45 dias; DH – alimentados com dieta hiperlipídica por 45 dias; FC – alimentados com dieta hiperlipídica e expostos à fumaça de cigarro por 45 dias; NAC - alimentados com dieta hiperlipídica, expostos à fumaça de cigarro e suplementados com

NAC por 45 dias; CESS - alimentados com dieta hiperlipídica, expostos à fumaça de cigarro por 45 dias e em cessação à fumaça de cigarro por 45 dias. Durante os períodos de exposição, foram aferidos a ingestão alimentar e peso corporal. Decorridos os tempos de exposição, para cada etapa, os animais sofreram eutanásia, o tecido adiposo (periepídidimo, mesentérico, peri renal e retro peritoneal) foi removido e pesado para se obter o índice de adiposidade, área adipocitária, conteúdo das espécies reativas por DCFH, bem como o conteúdo das proteínas pPKA, CGI-58, pHSL^{Ser660}. Em animais magros a fumaça de cigarro reduziu a ingestão alimentar e o peso corporal, não alterou o índice de adiposidade e área adipocitária, porém elevou os níveis das espécies reativas; os níveis proteicos das moléculas analisadas por *western blot* também foram aumentados. A suplementação com NAC em camundongos magros expostos à fumaça acarretou redução na ingestão alimentar, no peso corporal, sem alterar o índice de adiposidade e a área adipocitária; reduziu os níveis das espécies reativas e a atividade das lipases. A cessação à fumaça de cigarro em animais magros causou aumento da ingestão alimentar, do peso corporal, do índice de adiposidade, da área adipocitária, redução no conteúdo das espécies reativas e redução da ação da lipase. Em camundongos obesos, a exposição à fumaça de cigarro e a suplementação com NAC induziu redução na ingestão alimentar e redução no peso corporal. O índice de adiposidade aumentou na cessação; a área adipocitária não foi alterada; o conteúdo das espécies reativas reduziu na suplementação com NAC. Ocorreu aumento na atividade das moléculas envolvidas na lipólise nos camundongos obesos expostos à fumaça de cigarro e reversão quando suplementados com NAC e na cessação. Os resultados tomados em conjunto sugerem que em camundongos magros e obesos a fumaça de cigarro altera adiposidade, que parece ser modulada, pelo menos em parte, pelas espécies reativas, uma vez que a suplementação com NAC reverte os achados. Dessa forma, os dados sugerem que a fumaça de cigarro tem ação metabólica periférica. Acredita-se que os resultados do presente estudo poderão servir como base para apontar novos alvos terapêuticos que poderão ser extrapolados para a saúde pública, principalmente sobre o controle da massa adiposa/obesidade.

Palavras chave: Espécies Reativas; Fumaça de Cigarro; Lipólise; Tecido adiposo.

ABSTRACT

Obesity induces marked metabolic and molecular changes that are harmful to the body and can result in serious health problems, leading to a high prevalence of morbidity and mortality and high financial costs to the public health system. Further, there is a worldwide increase in both the prevalence of obesity and smoking, and this increase is a particular problem in Brazil. Smokers experience oxidative stress induced by cigarette smoke, and obesity potentiates this stress. On the other hand, cigarette smoke appears to modulate the important lipolytic enzymes such as Hormone-sensitive lipase, a key enzyme in the regulation of lipid metabolism, as well as the lipase of the triglycerides of adipocytes. Inappropriate eating habits and tobacco use increase the production of reactive species, but it is unclear how these processes can modulate weight control, especially related to fat mass. This information could provide insight into possible therapeutic targets for obesity. Therefore, this study aimed to evaluate the metabolic and molecular mechanisms by which exposure to cigarette smoke can influence the metabolism of lipids and weight control. The experiments were divided into four steps. In the first stage, Swiss lean mice were exposed to 4 commercial filter cigarettes (Tar 10 mg, Nicotine 0.8 mg, Carbon Monoxide 10 mg) per session, 3 sessions per day, every day of the week for 7D, 15D, 30D, 45D and 60D days ($n = 10$) and compared to the control group - CNT (no exposure). From the stage 1 results, we opted to use the group exposed for 45 days in the following steps. Groups of mice were divided into 4 groups for the next stage of the study: CNT- unexposed control; CNT / NAC - unexposed control supplemented with NAC; 45FC - exposed to cigarette smoke for 45 days; 45NAC - exposed to cigarette smoke supplemented with NAC for 45 days. The NAC dose was 60mg / kg / day. The third stage consisted of smoking cessation. The mice were divided into 6 groups: CNT - unexposed control; FC45 - exposed to cigarette smoke for 45 days; 7D, 15D, 30D and 45D - exposed to cigarette smoke for 45 days and cessation in their times. In the fourth stage, Swiss obese mice were exposed to cigarette smoke, supplemented with NAC and submitted to cessation, and distributed in the following groups: PD - fed a standard diet for 45 days; DH - fed with high fat diet for 45 days; CIG - treated fat diet and exposed to cigarette smoke for

45 days; NAC - treated fat diet, exposure to cigarette smoke and supplemented with N-acetylcysteine for 45 days; CESS - treated fat diet, exposed to cigarette smoke for 45 days and cease to cigarette smoke for 45 days. During periods of exposure, food intake and body weight were measured. Then, after the exposure times for each step, animals were euthanized, adipose tissue (epididymal, mesenteric, perirenal and peritoneal retro) was removed and the fat index, adipocyte area, content of reactive species by DCFH and the content of proteins associated with fat droplet and lipases (pPKA, CGI-58, p-HSL^{Ser660}) were analyzed. In lean animals, cigarette smoke reduced food intake and body weight, without changed the adiposity index and adipocyte area, but increased levels of reactive species; the protein levels of the molecules analyzed by western blot indicate increased lipolysis. Supplementation with NAC in lean mice exposed to fumes caused a reduction in food intake and body weight, without changing the adiposity index and adipocyte area, as well as reduced levels of the reactive species and the activity of lipases. Cessation of cigarette smoke in lean animals was related to increased food intake, body weight, adiposity index, and adipocyte area, and a reduction in the content of reactive species and the action of lipases. In obese mice, exposure to cigarette smoke and supplementation with NAC induced reduction in food intake and body weight. The adiposity index increased in cessation, whereas the adipocyte area was not changed and the content of reactive species was reduced in the supplementation with NAC. The content of lipases showed lipolytic patterns in obese mice exposed to cigarette smoke, those supplemented with NAC and even those in cessation, and this effect was especially present in the enzyme considered key in lipolysis pHSL^{Ser660}. The results suggest that in both lean and obese mice, cigarette smoke triggers a lipolytic action. This action appears to be modulated, at least in part, by the reactive species, as evident by how the NAC supplementation reverses the findings. Therefore, the results suggest that cigarette smoke has a direct peripheral metabolic action. It seems that the results of this study may serve as a basis to identify new therapeutic targets that could be extrapolated to healthcare, particularly to control of the presence of fatty masses.

Key-words: Reactive Species; Cigarette Smoke; Lipolysis; Fat.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Via de sinalização primária na lipólise em humanos.....	52
Figura 2 - Regulação de pPKA	54
Figura 3 - Câmara de inalação.....	65
Figura 4 - Efeitos metabólicos em camundongos magros expostos à fumaça de cigarro.	70
Figura 5 - Efeitos metabólicos em camundongos magros expostos à fumaça de cigarro	71
Figura 6 - Efeitos metabólicos e moleculares em camundongos magros expostos à fumaça de cigarro	72
Figura 7 - Efeitos metabólicos em camundongos magros expostos à fumaça de cigarro tratados com NAC	74
Figura 8 - Efeitos metabólicos em camundongos magros expostos à fumaça de cigarro tratados com NAC.....	75
Figura 9 - Efeitos metabólicos e moleculares em camundongos magros expostos à fumaça de cigarro tratados com NAC	76
Figura 10 - Efeitos metabólicos em camundongos magros na cessação à fumaça de cigarro	78
Figura 11 - Efeitos metabólicos em camundongos magros na cessação à fumaça de cigarro	79
Figura 12 - Efeitos metabólicos e moleculares em camundongos magros na cessação à fumaça de cigarro	80
Figura 13 - Efeitos metabólicos em camundongos obesos expostos à fumaça de cigarro tratados com NAC e na cessação	82

Figura 14 - Efeitos metabólicos em camundongos obesos expostos à fumaça de cigarro tratados com NAC e na cessação.....	83
Figura 15 - Efeitos metabólicos e moleculares em camundongos obesos expostos à fumaça de cigarro tratados com NAC e na cessação	84

LISTA DE ABREVIATURAS SIGLAS E SÍMBOLOS

AC-	Adenilato ciclase
ACC-	Acetil-CoA carboxilase
ABHD5-	Proteína hidrolase α/β contendo domínio 5
ADP-	Adenosina-5'-difosfato
AKT-	Proteína quinase B
AMP-	Adenosina monofosfato
AMPC-	Adenosina monofosfato cíclico
AMPK-	Proteína quinase ativada por AMP
ATGL-	Lipase dos triacilgliceróis do adipócito
ATP-	Adenosina trifosfato
CGI-58-	gene de identificação comparativa-58
CPT-1-	Carnitina palmitoil transferase
DAG-	Diacylglicerol
DCFH-DA-	2',7'-Diclorofluoresceína-diacetato
DM2-	Diabetes mellitus tipo 2
DPI-	Difeniliodonina
EDTA-	Ácido etilenodiaminotetracético
EPM-	Erro padrão da média
ERO-	Espécies reativas de oxigênio
FAS-	Ácido graxo sintase
G-1-P-	Glicerol-1-fosfato
GAP	– Proteína ativadora de GTPase
G _i -	Proteína inibitória acoplada
G _s -	Proteína estimulatória acoplada
GSH-	Glutathiona reduzida

H₂O₂- Peróxido de hidrogênio
DHL- Dieta hiperlipídica
HSL- Lipase hormônio sensível
IMC- Índice de massa corporal
JNK- c-Jun Quinase N-terminal
LKB1- Quinase hepática B1
LPL- Lipase lipoproteica
MAPK- Proteína quinase ativada por mitógeno
MGL- Lipase do monoacilglicerol
NAC- N-Acetilcisteína
nAChRs- Receptores acetilcolínico-nicotínicos
NADPHox- Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase
NEFA- Ácidos graxos livres não esterificados
NO- Óxido nítrico
O₂⁻ Ânion superóxido
OH⁻ Radical hidroxila
OMS- Organização mundial da saúde
ONOO⁻ Peroxinitrito
PE- Fosfatidiletanolamina
PI3K (I à III)- Fosfatidilinositol 3-quinase (classe I à III)
PKA- Proteína quinase A
PKC- Proteína quinase C
PLIN-A- Perilipina A
RYGB- Gastroplastia com by-pass gastrointestinal em Y-de-Roux
SNC- Sistema nervoso central
TAG- Triacilglicerol

WHO- Organização Mundial da Saúde

$^1\text{O}_2$ Oxigênio singlet

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	47
1.1 OBESIDADE	49
1.2 LIPÓLISE	51
1.3 PAPEL DAS ERO NA MODULAÇÃO DA LIPÓLISE	55
2 OBJETIVOS	59
2.1 OBJETIVO GERAL	59
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	59
3 MATERIAIS E MÉTODOS	61
3.1 ASPECTOS ÉTICOS	61
3.2 AMOSTRA E PROCEDIMENTOS	61
3.2.1 Etapa 1– Exposição de camundongos magros à fumaça de cigarro em diferentes tempos (<i>tempo-dependente</i>)	61
3.2.2 Etapa 2 – Exposição de camundongos magros à fumaça de cigarro no <i>time-course</i> tratados com NAC.....	62
3.2.3 Etapa 3 – Cessação de camundongos magros expostos à fumaça de cigarro	63
3.2.4 Etapa 4 - Exposição de camundongos obesos à fumaça de cigarro, em cessação e suplementados com NAC	63
3.2.5 Protocolo de exposição à fumaça de cigarro	64
3.2.6 Controle do consumo de ração, peso corporal e índice de adiposidade.....	65
3.2.7 Quantificação das espécies reativas por diacetato de difluoresceína (DCFH)	66
3.2.8 Análises dos níveis de proteínas e de fosforilação por <i>Western Blotting</i>	66

3.2.9 Avaliação histológica.....	67
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	68
4 RESULTADOS	69
4.1 Efeitos da exposição de camundongos magros à fumaça de cigarro	69
4.2 Efeitos da exposição de camundongos magros à fumaça de cigarro suplementados com NAC	73
4.3 Efeitos da cessação à fumaça de cigarro	77
4.4. Efeitos da exposição à fumaça de cigarro de camundongos obesos, suplementados com NAC e na cessação	81
5 DISCUSSÃO	85
6 CONCLUSÃO	93
REFERÊNCIAS	95
ANEXO A- Carta de aprovação da CEUA	107

1 INTRODUÇÃO

O sobrepeso e a obesidade alcançam proporções epidêmicas em todo o mundo, atingindo 1,1 bilhão de adultos e 10% das crianças (Haslam e James, 2005). Estudos epidemiológicos (OMS, 1995; Kopelman, 2000) apontam mudanças no padrão alimentar associadas a baixos níveis de atividade física como fatores de risco importantes para o desenvolvimento da obesidade. O sobrepeso e a obesidade são predisponentes de fatores de diversas doenças metabólicas, incluindo diabetes mellitus tipo 2 (DM2), esteatose hepática, hipertensão arterial, doenças cardiovasculares e alguns cânceres (Bray, 2004). Estudo mais recente sobre o assunto, realizado por Ezzati (2016), com objetivo de estimar as tendências do índice de massa corporal (IMC), tomando 1698 estudos com base em medidas de 19,2 milhões de pessoas em 200 países a partir de 1975 a 2014, apontou para um aumento do IMC de 21.7 kg/m² em 1975 para 24.2 kg/m² em 2014 para os homens e 22.1kg/m² em 1975 para 24.4 kg/m² em 2014 para as mulheres. Segundo o mesmo estudo a prevalência da obesidade padronizada por idade aumentou de 3,2% em 1975 para 10,8% em 2014 para homens e de 6,4% para 14,9% para as mulheres; 2,3% dos homens e 5,0% das mulheres são classificados como obesos severos (i.e. IMC ≥ 35 kg/m); globalmente, a prevalência da obesidade mórbida é de 0,64% em homens e 1,6% em mulheres. De acordo com a interpretação do estudo se esta tendência continuar, até 2025 a prevalência global de obesidade alcançará 18% nos homens e irá ultrapassar os 21% nas mulheres, enquanto que a obesidade severa ultrapassará os 6% nos homens e 9% nas mulheres. Esse quadro torna-se mais preocupante quando associado a outros hábitos extremamente maléficos, tal como fumar. Doenças associadas ao uso de tabaco representam 1 a cada 10 mortes na idade adulta, representando 6 milhões de mortes anuais, com projeções de que no ano de 2030 esse dado aumente para 1 a cada 6 mortes (OMS, 2013). De fato, a obesidade e o tabagismo, são causas de elevadas morbidade e mortalidade no Brasil e no mundo. De acordo com o estudo Framingham, a expectativa de vida de obesos fumantes foi 13 anos menor quando comparados a não fumantes eutróficos; a mortalidade dos fumantes obesos entre 40 e 70

anos de idade foi de um terço, enquanto que em não fumantes eutróficos esse número é de 10% (Fox et al., 2007).

O ganho de peso ao cessar o tabagismo é um fator que dificulta a decisão de parar de fumar. Além disso, a crença popular entre fumantes e não fumantes é de que o tabagismo representa uma maneira eficiente para o controle do peso corporal (Potter et al., 2004). Mais de 75% de fumantes formais ganham peso após cessarem esse hábito e isto é devido primariamente ao aumento na ingestão calórica, especialmente ao consumo de alimentos ricos em gordura e carboidratos, no entanto, a redução no gasto energético também desempenha importante papel neste processo (Filozof et al., 2004). Isso se deve em grande parte à ação de um dos principais componentes do cigarro, a nicotina; no caso de ex fumantes, a ausência dela. Apesar de um grande número de fatores contribuírem para o ganho de peso após cessar o uso de tabaco, que inclui aumento do apetite; a redução da lipólise no tecido adiposo também apresenta particular importância nos estoques de gordura corporal (Oeser et al., 1999).

Há tempos sabe-se que a fumaça de cigarro e/ou nicotina inibem a fome. Em humanos e ratos, a administração de nicotina ou fumaça de cigarro tem mostrado suprimir o consumo de alimentos (Grunberg, 1982; Grunberg et al., 1986). Por outro lado, a nicotina aumenta o gasto energético, o que consideravelmente explica porque fumantes tendem a ter menor peso corporal que não fumantes e, porque parar de fumar é frequentemente seguido de ganho de peso. Em camundongos, a nicotina reduz o ganho de peso, sendo este efeito dose-dependente, ou seja, quanto maior a dose de nicotina menor é o ganho de peso (Mangubat et al., 2012). Estudo realizado por Bellinger et al., (2010) demonstrou aumento no metabolismo energético de roedores expostos à nicotina.

A obesidade *per se* induz marcantes alterações metabólicas que são maléficas ao organismo e podem resultar em graves problemas de saúde, acarretando alta prevalência de morbidade e mortalidade e causando custos financeiros elevados ao sistema de saúde pública. Além do estilo de vida sedentário, é crescente o número de indivíduos obesos fumantes no Brasil e no mundo. A obesidade e o tabagismo, podem agir sinergicamente e gerar alterações metabólicas e moleculares exacerbadas.

Diversos estudos apontam para o fato de que a fumaça de cigarro ou seus componentes aumentam o gasto energético, inibem a fome, aumentam a lipólise e consequentemente levam a perda de peso corporal (Stamford et al., 1986; Filozof, 2004; Mineur et al., 2011; Ypsilantis et al., 2013). No entanto, esses estudos analisaram os possíveis mecanismos envolvidos a nível de sistema nervoso central (SNC). Estudos que avaliam os efeitos diretos da fumaça de cigarro sobre os tecidos periféricos, especialmente sobre o tecido adiposo, são inexistentes.

1.1 OBESIDADE

A obesidade é uma doença crônica não transmissível com maior incidência e prevalência no mundo. Conforme a Organização Mundial da Saúde (OMS), obesidade é definida como o acúmulo anormal ou excessivo de gordura corporal. A obesidade, geralmente é estimada pelo índice de massa corporal (IMC), calculado dividindo-se o peso (em quilogramas) pela altura (em metros) ao quadrado (OMS, 1995). Do ponto de vista clínico, obesidade é definida como um estado de elevado peso corporal, mais especificamente de tecido adiposo, de magnitude suficiente para produzir consequências adversas à saúde, tais como problemas cardiovasculares e diabetes mellitus tipo 2 (DM2), (Kopelman, 2000).

Segundo dados da OMS, estima-se que aproximadamente 1 bilhão de adultos em todo o mundo possuem sobrepeso (IMC entre 25 e 30 kg/m²) ou obesidade (IMC ≥30 Kg/m²), ainda apontam para prevalências de obesidade da ordem de 50% nos Estados Unidos, podendo ultrapassar a barreira dos 25% no Brasil, até 2025. Outro achado preocupante segundo a OMS está na prevalência da obesidade entre crianças e adolescentes, segundo a qual 10% dos indivíduos entre 5 e 17 anos estão acima do peso, sendo que de 2 a 3% são obesos. Novas projeções epidemiológicas indicam que o número de obesos continua crescendo em diferentes regiões do planeta. Fatores como a mudança no hábito alimentar e o estilo de vida sedentário, aliados a determinantes genéticos ainda pouco conhecidos, desempenham um papel relevante na gênese desta doença (Cintra et al., 2011).

A hipótese mais aceita para o crescimento epidêmico da obesidade e diabetes, considera as mudanças demográficas e as

alterações no padrão alimentar e de redução do nível de atividades físicas, como os aspectos que contribuem para a maior incidência das doenças crônicas não transmissíveis da atualidade, pois tem como desdobramento o aumento do peso corporal e vários outros desfechos desfavoráveis à saúde, como diabetes, doenças cardiovasculares, hepáticas, renais entre outras (Cintra et al., 2011).

A obesidade pode ser classificada conforme a localização corporal da gordura, podendo ser do tipo androide, em que a gordura se localiza principalmente na região intra-abdominal (tipo maçã, mais frequente nos homens) ou ginoide, quando a gordura se encontra primordialmente na região gluteofemoral (tipo pera, mais frequente no sexo feminino). A obesidade androide tem correlação com as complicações cardiovasculares e metabólicas, enquanto que a obesidade ginoide está relacionada às complicações vasculares periféricas, problemas ortopédicos e estéticos (Chan et al., 1994).

A obesidade constitui-se em condição médica crônica de etiologia multifatorial, o que requer tratamento de múltipla abordagem (Segal et al., 2002). Atualmente, existem diversos tratamentos para a perda de peso, dentre os quais se destaca uma variedade de dietas, psicoterapias, medicamentos e programas de atividades físicas, bem como diferentes métodos cirúrgicos. No campo das cirurgias bariátricas, uma classificação quanto ao tipo de cirurgia, caracteriza-se como disabsortiva, a qual consiste em uma diminuição no tamanho do intestino delgado para aproximadamente 50 cm, que infelizmente, apresenta alguns desfechos desfavoráveis como diarreia, perda excessiva de peso (60 a 70% do peso) e desnutrição grave (Zeve e Tomaz, 2011). Ainda no campo da cirurgia bariátrica, outra classificação descrita, constitui o método restritivo o qual consiste em uma redução da cavidade gástrica. Porém, o sucesso com relação à perda de peso e controle de doenças associadas não é tão efetivo quando comparado à outras técnicas, devido a recuperação de peso (Buchwald et al., 2004; Buchwald et al., 2009; Zilberstein et al., 2011).

Diante do exposto, no que se refere aos métodos para o tratamento da obesidade, sem exceção, todos apresentam alguma inconveniência ou efeito colateral, em algumas situações até tornam-se ineficientes. Praticamente em sua grande maioria, apresentam custo financeiro elevado. Assim, novos alvos

terapêuticos, que possam aumentar a lipólise e o gasto energético, obrigatoriamente, precisam ser investigados, identificados, para o combate efetivo da epidemia da obesidade.

1.2 LIPÓLISE

A queda dos níveis séricos de insulina e glicose durante o jejum promovem a utilização das reservas lipídicas, processo denominado lipólise (Kolditz e Langin, 2010). A ativação da lipólise ocorre principalmente através da ação da lipase sensível à hormônio (HSL) que pode ser ativada pelo sistema nervoso simpático, glucagon, adrenalina e glicocorticoides (Klein e Romijn, 2008). Nesse sentido, algumas drogas são testadas com a finalidade de aumentar o gasto energético, favorecendo a lipólise, possivelmente por agir sobre importantes enzimas, tais como a proteína kinase A (PKA), a lipase dos triacilgliceróis do adipócito (ATGL) e a HSL.

O estímulo da lipólise pelas catecolaminas ocorre através da sua ligação com os receptores adrenérgicos (receptores transmembrana sete hélices) (Cannon e Nedergaard, 2004; Nielsen et al 2014). Após a ligação das catecolaminas, os receptores agem promovendo a troca de GTP a GDP, o que resulta em ativação da proteína G. O principal papel da proteína G é modular a conversão de ATP em AMP cíclico pela ação da adenilato ciclase (AC), a qual eleva os níveis do amp cíclico que por vez ativa PKA, PKA ativada fosforila a perilipina e HSL, induzindo a função lipolítica (Cannon e Nedergaard, 2004, Londos et al, 2011). Os receptores β -adrenérgicos são acoplados a proteínas G e promovem a lipólise no tecido adiposo (Lonnqvist et al., 1995). (Figura 1).

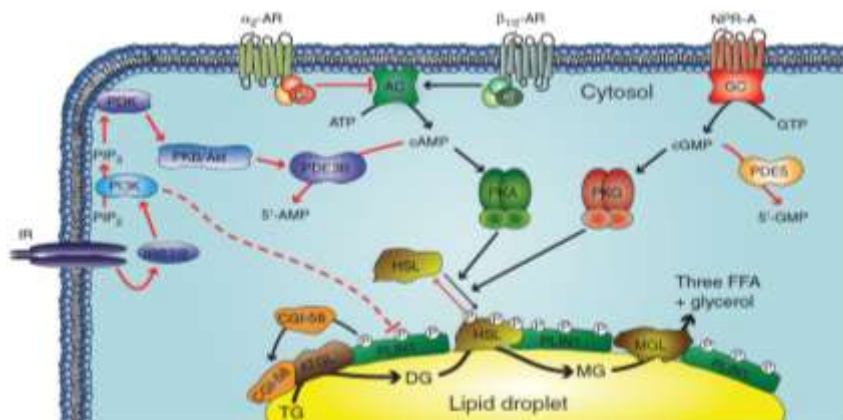


Figura 1. Via de sinalização primária na lipólise em humanos. As linhas pretas e vermelhas indicam eventos de sinalização pro e antilipolíticos, respectivamente. As setas indicam estimulação e ou translocação e linhas ponteadas indicam inibição. A estimulação da lipólise é dependente da fosforilação da HSL e de PLIN1 mediadas pela PKA ou PKG. A PKG é ativada pela cGMP, que está aumentada em resposta a ativação dos NPR-A a GC-acoplada. Similarmente, a estimulação dos receptores $\text{AR}\beta_{1/2}$ acoplados a proteína G_s ativa AC, que gera cAMP e ativa a PKA. De modo inverso, a ativação dos receptores adrenérgicos $\text{AR}\alpha_2$ acoplados a proteína G_i inibe a AC e assim reduz a sinalização dependente de cAMP para a lipólise. A estimulação da via de sinalização da insulina através do IR aumenta a atividade de PDE3B, que converte cAMP a 5'-AMP, assim diminuindo a atividade da PKA e suprimindo a lipólise. A atividade da PKG é reduzida pela conversão PDE5-mediada do cGMP à 5'-GMP, embora a sinalização acima deste processo seja atualmente desconhecida. As linhas tracejadas indicam uma via aceitável da via da insulina Akt independente agindo seletivamente na PLIN1. α_2 -ARs- receptores adrenérgicos α_2 ; AC- Adenil ciclase; TG- triglicerídeos; ATGL- lipase do triacilglicerol adiposo; $\beta_{1/2}$ -ARs, β_1 - e β_2 -receptores adrenérgicos; gene de identificação comparativo CGI-58; DG- Diacilglicerol; FFA – ácido graxos livres; GC-guanilil ciclase; HSL- Lipase hormônio sensível; IR- Receptor de Insulina; IRS1/2, IR substrato 1 e 2; MG, monoacilglicerol; MGL- Lipase do Monoacilglicerol; NPR-A, Receptor natriurético tipo-A; PDE3B- Fosfodiesterase 3B; PDK- quinase dependente de fosfoinositídeos; PI3K- quinase fosfatidilinositol3; PKA- proteína quinase A; PKB/Akt- proteína quinase B; PLIN1, perilipina 1. Adaptado de Nielsen et al 2014. Journal of Molecular Endocrinology (2014).

Além da estimulação do tecido adiposo através dos receptores adrenérgicos, o tecido adiposo é influenciado diretamente por ligantes que agem sobre os receptores acetilcolínico nicotínicos, os quais tiveram várias subunidades detectadas em adipócitos isolados (Liu et al., 2004), tanto no tecido adiposo branco quanto marrom de roedores (Gochberg-Sarver et al., 2012) e de humanos (Cancello et al., 2012). Dentre os ligantes que acoplam aos receptores acetilcolínico nicotínicos, destaca-se a própria nicotina, o princípio ativo mais estudado do cigarro, que possui como um dos efeitos colaterais a perda de peso (Andersson e Arner, 2001). Estudo realizado por Albuquerque et al., (2001) demonstrou que camundongos obesos induzidos por dieta e tratados com galantamina, um agente modulador alostérico dos receptores $\alpha 7$ nAChR, apresentaram redução do peso corporal, da ingestão alimentar, adiposidade abdominal, níveis de citocinas e adipocinas, bem como melhora significativa dos níveis sanguíneos de glicose.

A hidrólise dos triacilgliceróis (TAG) do tecido adiposo resulta na liberação de ácidos graxos e glicerol, e ocorre através de ação coordenada de três lipases: lipase do triacilglicerol do adiposo (ATGL), lipase hormônio sensível (HSL) e a lipase do monoacilglicerol (MGL). A ativação da ATGL, um processo não diretamente atribuído à PKA (Zimmermann et al., 2004; Nielsen et al, 2014), facilita a conversão do TAG em diacilglicerol (DAG). ATGL é considerada uma enzima essencial para a atividade lipolítica do tecido adiposo. Identificada em 2004, a ATGL é altamente expressa no tecido adiposo branco e marrom, e em menor grau nos testículos, músculo cardíaco e músculo esquelético (Zimmermann et al., 2004). Essa enzima catalisa a primeira hidrólise da ligação éster do TAG, gerando uma molécula de ácido graxo livre e DAG (Schweiger et al., 2006). Experimentos em animais com deficiência de ATGL demonstraram que a ativação dessa enzima é necessária para a lipólise. Na ausência de ATGL, a mobilização de ácidos graxos não esterificados (NEFA) em resposta as catecolaminas são reduzidas em aproximadamente 70% (Lass et al., 2006; Zechner et al., 2010), (Figura 2).

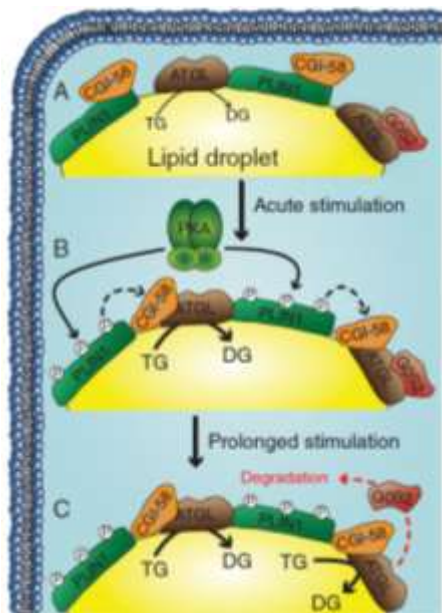


Figura 2. Regulação de pPKA. (A) no estado basal. CGI-58 está associado com a PLIN1 e a atividade ATGL é baixa. (B) após a fosforilação de PLIN1, CGI-58 é liberado e se associa com ATGL, o que aumenta a atividade ATGL. Nesta fase, uma porção do conjunto ATGL é inibida pelos domínios G0S2. (C) se a estimulação lipolítica persistir, a degradação gradual de um G0S2 promove aumento adicional na atividade de ATGL. TG, triglicerídeos; ATGL, adiposo lipase TG; CGI-58, gene comparativa identificação-58; DG, diacilglicerol; G0S2, G0 / G1 gene comutador 2; PKA, a proteína cinase A; PLIN1, perilipin 1. Adaptado de Nielsen et al 2014. *Journal of Molecular Endocrinology* (2014).

Para a atividade completa de hidrolase da ATGL é necessário a interação com seu cofator, denominado identificador de comparativo genético 58 - proteína hidrolase α/β contendo domínio 5 (CGI-58/ABHD5) (Lass et al., 2006). Em situação não estimulada, a CGI-58 está fortemente ligada a gotículas de lipídios interagindo com perilipina A (Zechner et al., 2012). No entanto, na presença de estímulos, ocorre a dissociação entre CGI-58 e perilipina A, possibilitando a associação de CGI-58 com a ATGL (Yamaguchi et al., 2004). Perilipina A é uma proteína estrutural que reveste a gotícula de lipídios e protege a molécula de triacilglicerol contra a hidrólise

basal, permitindo assim seu estoque no adipócito (Martinez-Botas et al., 2000; Sztalryd et al., 2003). Animais que não expressam perilipina A (*null mice*) demonstram marcante redução do tecido adiposo (Tansey et al., 2001). A interação entre perilipina A e CGI-58 aumenta a atividade hidrolítica da ATGL em até 20 vezes em ratos e aproximadamente 5 vezes em humanos (Zimmermann et al., 2004). Em adição, animais com mutação na CGI-58 apresentam menor atividade de ATGL (Gruber et al., 2010).

Após a hidrólise da primeira ligação éster do TAG, com consequente formação de DAG, a proteína HSL é responsável pela hidrólise da segunda ligação éster, liberando a segunda molécula de ácido graxo livre e formando monoacilglicerol (Zimmermann et al., 2009; Nielsen et al. 2014). HSL é fosforilada em pelo menos 5 resíduos de serina pelas enzimas: proteína quinase A (PKA), proteína quinase ativada por níveis de AMP (AMPK) e proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (Holm, 2004). Juntos, a fosforilação da HSL e sua translocação para a superfície da gotícula de gordura, acoplados com a ativação da ATGL pelo CGI-58, resultam na hidrólise de 90% do TAG. Vários estudos comprovaram que a fosforilação da HSL e da perilipina são essenciais para completa lipólise estimulada por catecolaminas ou por agonistas beta-adrenérgicos (Tansey et al., 2003; Miyoshi et al., 2006; Shen et al., 2009). A última lipase envolvida na lipólise é a lipase do monoacilglicerol (MGL). MGL hidrolisa a última ligação éster do glicerol, de maneira não regulada hormonalmente (Fredrikson et al., 1986).

1.3 PAPEL DAS ESPÉCIES REATIVAS NA MODULAÇÃO DA LIPÓLISE

O cigarro e/ou nicotina modulam o metabolismo energético, porém os mecanismos através dos quais isto ocorre permanecem obscuros. No entanto, tem sido apontado que o estresse oxidativo pode estar envolvido neste processo (Grunberg, 1986). O estresse oxidativo ocorre nas células como consequência de um desequilíbrio no sistema redox, em que a produção de radicais livres/espécies reativas é maior do que os níveis de antioxidantes (Roberts e Sindhu, 2009). ERO são moléculas instáveis, altamente reativas, que possuem elétrons não pareados em seus orbitais externos (Kohen e Nyska, 2002).

A fim de recuperar sua estabilidade, ligam-se a compostos estáveis retirando elétrons, originando espécies reativas (Halliwell e Gutteridge, 2007). As espécies reativas de oxigênio incluem os radicais livres, ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$), radical hidroxila (OH^{\cdot}), radicais lipídicos e espécies não radicalares como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio *singlet* (1O_2) (Steinbrenner e Sies, 2009). Essas podem ser produzidas por diferentes vias. A cadeia respiratória mitocondrial é a principal fonte, uma vez que ela possui vários centros redox, capazes de transferir um elétron da molécula de oxigênio para formar ânion superóxido (Echtay, 2007; Angelopoulou et al., 2009). Outras enzimas, como as oxidases de membrana mitocondrial, são também importantes fontes de ERO (Cho et al., 2011).

Além disso, espécies reativas podem ser produzidas por fatores externos. Estudo realizado por An et al., (2007), observou que a nicotina aumenta significativamente a produção de ERO, tais como H_2O_2 e induz uma variedade de efeitos celulares, incluindo danos às membranas e às proteínas mitocondriais, reduzindo o potencial redox dessas organelas e aumentando ainda mais a produção de ERO (Bellinger et al., 2010; Brunk e Terman, 2002).

Estudos têm mostrado que as ERO em concentrações fisiológicas desempenham funções celulares importantes. As ERO medeiam ativação da cascata de sinalização para o crescimento, diferenciação, proliferação e apoptose (Allen e Tresini, 2000; Dröge, 2002; Ji, 2007). Porém, o seu envolvimento no metabolismo lipídico não está claro. Segundo alguns estudos, as ERO estão envolvidas na regulação da lipólise (Wolfe et al., 1987; Campbell et al., 1994; Talior et al., 2003; Furukawa et al., 2004; D'Autreaux et al., 2007). Na obesidade, há aumento no conteúdo de ERO no tecido adiposo, devido ao aumento de agentes inflamatórios e o consumo alimentar excessivo. Como consequência ao aumento de ERO, ocorre a fosforilação e ativação da HSL^{Ser552}, o que resulta em aumento da lipólise (Krawczyk et al., 2012). Por outro lado, o uso de antioxidantes como a N-acetilcisteína (NAC), difeniliodonina (DPI) e o resveratrol reduzem este efeito (Krawczyk et al., 2012).

A obesidade está relacionada ao aumento na produção de espécies reativas e isso resulta em alterações no metabolismo celular (Furukawa et al., 2004). A fumaça de cigarro também induz o aumento de espécies reativas, o que pode

alterar ainda mais o metabolismo adipocitário. Desta forma, nesse estudo hipotetizamos que o aumento das espécies reativas, induzido pela fumaça de cigarro, pode culminar em aumento da lipólise do tecido adiposo e que esses efeitos são ainda mais significativos em obesos. Diante disto, o presente estudo buscou avaliar os efeitos metabólicos e moleculares da exposição à fumaça de cigarro no tecido adiposo de camundongos magros e obesos sob a perspectivas de controle do peso corporal.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos metabólicos, moleculares da exposição à fumaça de cigarro no tecido adiposo de camundongos magros e obesos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar os efeitos da fumaça de cigarro sobre os parâmetros de ingestão alimentar, peso corporal, índice de adiposidade, área adipocitária e níveis proteicos de moléculas lipolíticas e oxidativas de camundongos magros;
- b) Avaliar os efeitos da fumaça de cigarro sobre os parâmetros de ingestão alimentar, peso corporal, índice de adiposidade, área adipocitária e níveis proteicos de moléculas lipolíticas e oxidativas de camundongos magros suplementados com NAC;
- c) Avaliar os efeitos da cessação à fumaça de cigarro sobre os parâmetros de ingestão alimentar, peso corporal, índice de adiposidade, área adipocitária e níveis proteicos de moléculas lipolíticas e oxidativas de camundongos magros;
- d) Avaliar os efeitos da fumaça de cigarro, cessação à fumaça de cigarro, suplementação com NAC sobre os parâmetros de ingestão alimentar, peso corporal, índice de adiposidade, área adipocitária e níveis proteicos de moléculas lipolíticas e oxidativas de camundongos obesos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

A metodologia do presente estudo seguiu os princípios éticos para o uso de animais de laboratório determinados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). Este projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC sob o protocolo número 01/2013-2 (Anexo A) e respeitou estritamente os princípios éticos na experimentação animal. Após os experimentos, os animais foram acondicionados em saco branco leitoso e alocados em freezer (conservação) na própria universidade. Após isso, foram coletados e transportados por uma empresa terceirizada. Os resíduos foram tratados fisicamente e posteriormente encaminhados para disposição final em aterro sanitário. Todos os procedimentos estão de acordo com a RDC nº 306/2004 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária).

3.2 AMOSTRA E PROCEDIMENTOS

3.2.1 Etapa 1– Exposição de camundongos magros à fumaça de cigarro em diferentes tempos (*tempo-dependente*)

Nesta etapa, foi determinado o *time-course* da exposição de camundongos magros à fumaça de cigarro. Para isso, foram utilizados 60 camundongos *Swiss* machos, com 60 dias de idade, provenientes do biotério da UNESC, pesando entre 30 e 35g. Os camundongos foram alojados em gaiolas plásticas, com cobertura metálica. Os camundongos foram inicialmente divididos aleatoriamente em 6 grupos (n=10): camundongos alimentados por 8 semanas com dieta padrão para roedores: 19,0% de proteína, 56,0% de carboidrato, 3,5% de lipídios (11%Kcal/g), 4,5% de celulose, 5,0% de vitaminas e minerais o que corresponde a aproximadamente 3,78 kcal/g (Nuvilab CR1, Nuvital Nutrientes S/A). Após, os camundongos foram divididos em diferentes grupos de exposição, a saber: i) controle (sem exposição); ii) 7; iii) 15; iv) 30; v) 45; vi) 60 dias. Os camundongos receberam água e ração *ad libitum*. O ambiente foi

mantido em 70% de umidade e temperatura em 20 ± 2 °C com ciclo claro-escuro de 12h. Durante o período de exposição, foram avaliadas as variáveis consumo de ração e peso corporal. O alimento ingerido foi calculado diariamente a partir da subtração da quantidade ofertada pela quantidade restante de ração no comedouro. Decorrido o período de exposição, foram extraídos e pesados os tecidos adiposos periepídimal, mesentérico, retroperitoneal e perirrenal para o cálculo do índice de adiposidade (grama de gordura/grama peso corporal - %). Amostras do tecido adiposo periepídimal foram coletadas para realização do western blot, histologia e níveis de DCFH.

3.2.2 Etapa 2 – Exposição de camundongos magros à fumaça de cigarro suplementados com NAC

Uma vez que os *time-course* de 45 e 60 dias de exposição à fumaça de cigarro em camundongos magros apresentaram uma redução importante no índice de adiposidade, bem como aumento nos parâmetros de estresse oxidativo por DCFH, o tempo de 45D foi utilizado para exposição de camundongos magros à fumaça de cigarro suplementados com NAC (N-acetil-cisteína). Dessa forma, para avaliar os efeitos da fumaça de cigarro sobre o tecido adiposo, quatro grupos de camundongos foram estabelecidos: i) controle (não expostos); ii) controle suplementado com NAC (não expostos); iii) 45 dias de exposição à fumaça de cigarro; iv) 45 dias de exposição à fumaça de cigarro com concomitante suplementação com NAC. A suplementação com o antioxidante foi realizada diariamente através de gavagem oral por um período de 45 dias. A dimensão da cânula foi suficiente para alcançar a orofaringe. A NAC (Zanbon Brasil, São Paulo, São Paulo) foi administrada, diariamente, na concentração de 60 mg/kg, em um volume total de 0,5ml (Farombi et al., 2008). Durante o período de exposição, foram avaliadas as variáveis consumo de ração e peso corporal. Decorridos os tempos de exposição, os animais foram eutanasiados para coleta das amostras. Os tecidos adiposos periepídimal, mesentérico, retro peritoneal e peri renal foram extraídos para o cálculo do índice de adiposidade (grama de gordura/grama peso corporal - %). Amostras do tecido adiposo periepídimal foram coletadas para realização do western blot, histologia e níveis de DCFH.

3.2.3 Etapa 3 – Cessação da exposição à fumaça de cigarro em camundongos magros

Para avaliar os efeitos da fumaça de cigarro sobre o tecido adiposo, seis grupos de camundongos (n=10) foram utilizados: i) controle (não expostos); ii) 45 dias de exposição à fumaça de cigarro iii) 45 dias de exposição à fumaça de cigarro e seguido de 7 dias de cessação; iv) 45 dias de exposição à fumaça de cigarro e 15 dias de cessação; v) 45 dias de exposição à fumaça de cigarro e 30 dias de cessação e vi) 45 dias de exposição à fumaça de cigarro e 45 dias de cessação.

No decorrer do período de exposição, foram monitoradas as variáveis consumo de ração e peso corporal. Após os respectivos períodos de exposição e cessação os tecidos adiposos periepídimal, mesentérico, retroperitoneal e perirrenal foram coletados para o cálculo do índice de adiposidade (grama de gordura/grama peso corporal - %). Amostras do tecido adiposo periepídimal foram utilizadas para os procedimentos do western blot, histologia e níveis de DCF.

3.2.4 Etapa 4 - Exposição de camundongos obesos à fumaça de cigarro, em cessação ou suplementados com NAC

Os camundongos foram divididos aleatoriamente em 5 grupos (n=10): i) controle, alimentado com dieta padrão, ii) controle obesos (alimentados com dieta hiperlipídica), iii) camundongos obesos expostos à fumaça de cigarro por 45 dias, iv) camundongos obesos expostos à fumaça de cigarro por 45 dias e concomitantemente suplementados com NAC e v) camundongos obesos, expostos à fumaça de cigarro por 45 dias e seguidos de cessação de 45 dias. Para instalação da obesidade os camundongos foram alimentados por 8 semanas com dieta hiperlipídica (DH): (carboidrato: 70%; proteína: 20%; gordura 10%, totalizando 5.4 kcal/g) (PragSoluções Serviços e Comércio Ltda, Jaú, SP). Estudos do nosso grupo têm demonstrado que o tratamento de camundongos Swiss com dieta rica em gordura saturada (DH) leva a marcante obesidade após 3 meses de alimentação (De Souza et al., 2005). Os camundongos receberam água e alimento *ad libitum*. A NAC foi administrada na concentração de 60 mg/kg de peso corporal, diariamente, via oral, por gavagem. Durante o período de exposição, foram

avaliadas as variáveis consumo de ração e peso corporal. Foram extraídos os tecidos adiposos periepídidimo, mesentérico, retro peritoneal e peri renal para o cálculo do índice de adiposidade (grama de gordura/grama peso corporal - %). Amostras do tecido adiposo periepídidimo foram coletadas para realização do western blot, histologia e níveis de DCFH.

3.2.5 Protocolo de exposição à fumaça de cigarro

Os animais foram expostos à fumaça de 4 cigarros comerciais com filtro contendo alcatrão 10mg; nicotina 0,8mg; monóxido de carbono 10mg (Marlboro, Philip Morris) por sessão, 3 sessões/dia (8:30h, 13:30h e 17:30h), todos os dias da semana por 7, 15, 30, 45 e 60 dias (Tabela 1). Os animais foram mantidos em exposição à fumaça de cada cigarro durante 6 minutos em uma câmara de inalação em acrílico com divisórias (adaptado pelo autor) (40cm x 30cm x 25cm), cuja capacidade total foi de 30 litros (Figura 3).

Cada cigarro foi acoplado a uma seringa de plástico de 60 ml com a qual se injetou a fumaça no interior da câmara de inalação. O procedimento de insuflar e desinsuflar a seringa foi finalizado com a queima do cigarro até o seu terço final, que durou em média 3 minutos. Decorridos os 6 minutos, a cobertura superior da caixa foi retirada e, ligando o exaustor da capela, a fumaça foi evacuada durante 1 minuto, onde os animais entraram em contato com o ar ambiente. O procedimento se repetiu com os demais cigarros. A concentração média de monóxido de carbono no interior da caixa variou entre 499-732 ppm (avaliado com medidor de monóxido de carbono digital portátil Instrutherm) durante o período de exposição. Os animais ventilando em ar ambiente nas mesmas condições foram considerados controle (Valença et al., 2004; Menegali et al., 2009). Cada cigarro gera aproximadamente 1 L de fumaça que foi diluído em 30 L (capacidade da câmara). A concentração de fumaça no interior da câmara foi de 3% durante a exposição.



Figura 3 – Câmara de Inalação (40 cm de comprimento, 30 cm de largura e 25 cm de altura).

Tabela 1. Protocolo de exposição à fumaça de cigarro.

	Manhã (8:30h)	Tarde (13:30h)	Noite (17:30h)	Tempo/cigarro	Tempo/exaustão
Domingo	4 cig.	4 cig.	4 cig.	6 min.	1 min.
Segunda	4 cig.	4 cig.	4 cig.	6 min	1 min.
Terça	4 cig.	4 cig.	4 cig.	6 min	1 min.
Quarta	4 cig.	4 cig.	4 cig.	6 min	1 min.
Quinta	4 cig.	4 cig.	4 cig.	6 min	1 min.
Sexta	4 cig.	4 cig.	4 cig.	6 min	1 min.
Sábado	4 cig.	4 cig.	4 cig.	6 min	1 min.

Após a última exposição, os animais sofreram eutanásia e as amostras do tecido adiposo foram coletadas para posterior análise de peso, molecular e bioquímica.

3.2.6 Controle do consumo de ração, peso corporal e índice de adiposidade

O alimento ingerido foi calculado semanalmente a partir da subtração da quantidade ofertada pela quantidade restante de ração no comedouro. O volume de ingestão diária foi calculado,

tomando o consumo de ração semanal dividindo por sete. O peso dos animais foi verificado semanalmente com a utilização de uma balança de precisão da marca Marte, modelo AS 2000C nº 259711. Decorridos os períodos de cada etapa, os animais foram eutanasiados e extraídos os tecidos adiposos (por dissecação cirúrgica) periepídidimal, mesentérico, retro peritoneal e peri-renal para o cálculo do índice de adiposidade (grama de gordura /grama peso corporal x 100%).

3.2.7 Quantificação das espécies reativas por diacetato de difluoresceína (DCFH)

DCFH é uma técnica bastante utilizada como meio de detecção da produção de radicais livres totais. A oxidação do DCFH causa a fluorescência da difluoresceína que pode facilmente ser lida em fluorímetro. Neste ensaio, 100 µL de água e 75 µL de DCFH-DA foram adicionados a 25 µL de homogeneizado de amostra, homogeneizados em vórtex e levados ao banho-maria 37°C ao abrigo da luz por um período de 30 minutos. Separadamente, foi preparada a curva de calibração onde se utilizou como padrão o DCF 0,1 µM diluído em tampão fosfato/EDTA em pH 7,4 em diferentes concentrações. Tanto as amostras quanto a curva de calibração foram processadas em duplicata e ao abrigo da luz. Ao final dos trinta minutos foram feitas as leituras no fluorímetro (488 nm excitação e 525 nm de emissão). Os resultados foram expressos em nmol de DCF por mg de proteínas (Wang e Joseph, 1999).

3.2.8 Análises dos níveis proteicos e de fosforilação por *western blot*

Doze horas após a última sessão de exposição à fumaça de cigarro os animais sofreram eutanásia por guilhotina, o tecido adiposo periepídidimal foi extraído e imediatamente homogeneizado em tampão específico contendo 1% de Triton X 100, 100mM de Tris (pH 7,4), 100mM de pirofosfato de sódio, 100mM de fluoreto de sódio, 10mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), 10mM de vanadato de sódio, 2mM de PMSF e 0,1 mg/mL de aprotinina a 4°C com Polytron MR 2100 (Kinematica, Suíça). O homogeneizado foi centrifugado a 11000 rpm por 30 minutos a 4°C. No sobrenadante determinou-

se a concentração de proteínas totais (por teste colorimétrico), utilizando-se para isso o método de Lowry et al (1951). As proteínas foram ressuspensas e conservadas em tampão Laemmli, contendo 100 mmol/L de DTT (Laemmli, 1970) e posteriormente realizada a determinação do *imunoblotting* com anticorpos específicos. Para isso, alíquotas contendo 250µg de proteína por amostra foram aplicadas sobre gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). A eletroforese foi realizada em cuba Mini-PROTEAN® Tetra electrophoresis system (Bio-Rad, Hércules, Estados Unidos da América), com solução tampão para eletroforese. As proteínas separadas no SDS-PAGE, foram transferidas para a membrana de nitrocelulose, utilizando-se o equipamento de eletrotransferência Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad, Hércules, Estados Unidos da América). As membranas de nitrocelulose contendo as proteínas transferidas foram incubadas em solução bloqueadora por 2 horas, à temperatura ambiente, para diminuir as ligações proteicas inespecíficas. A seguir, as membranas foram incubadas com anticorpos primários específicos: anti-pPKA (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), anti-CGI-58 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), anti-pHSL^{ser660} Cell Signalling Biotechnology (Beverly, Estados Unidos da América) e β-Actina (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos da América), sob agitação constante e *overnight* à 4°C. A seguir, as membranas foram incubadas em solução com anticorpo secundário conjugado com peroxidase, durante 2 horas à temperatura ambiente. Após, as membranas foram incubadas por dois minutos com substrato enzimático e expostas ao filme de RX em cassete de revelação autorradiográfica. A intensidade das bandas foi determinada através da leitura das marcações radiográficas no filme de Raio X e reveladas por densitometria ótica, utilizando um *scanner* (HP G2710) e o programa *Scion Image* (Scion Corporation, Frederick, Estados Unidos da América). As membranas originais foram reblotadas com β-actina como proteína controle.

3.2.9 Avaliação histológica

Fragmentos do tecido adiposo foram coletados e colocados em frasco contendo paraformaldeído tamponado à 5% por 12 horas. As amostras foram então processadas com álcool

em diferentes concentrações (70%, 80%, 95% e 100 %), xilol, e xilol/parafina. A seguir, o tecido foi incluído em blocos de parafina, seccionado em cortes de 5 μm e fixados em lâminas de microscopia. Após um repouso de cerca de 24 horas (para completa fixação dos cortes) as lâminas foram desparafinizadas com xilol, re-hidratadas em diferentes concentrações de álcool. Em seguida foi realizada a coloração com hematoxilina e eosina. A aquisição das imagens se deu através de microscopia óptica (Nikon Eclipse Ti-U). Para avaliação da área adipocitária foi utilizado o software Image-Pro Plus 6, o qual passou por calibração. Inicialmente foi determinada a área de interesse (AOI), de 421300 μm^2 , em forma de um quadrado. As células avaliadas foram àquelas que se encontravam em contato com a linha superior e direita da AOI, bem como no interior da área de interesse. Os adipócitos margeados pelas linhas esquerda e inferior da AOI não foram analisados.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM), e analisados estatisticamente através de análise de variância (ANOVA) one-way, seguida do teste post hoc Tukey. Adotou-se nível de significância $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada através do software GraphPad Prisma versão 6.0 para *Microsoft Windows*.

4 RESULTADOS

4.1 Efeitos da exposição de camundongos magros à fumaça de cigarro

Uma vez que o presente trabalho teve por objetivo avaliar as alterações ponderais, metabólicas e moleculares em camundongos magros e obesos, expostos à fumaça de cigarro, num primeiro momento os grupos foram selecionados com o objetivo de verificar em qual tempo ocorreriam as máximas alterações. Os resultados apontaram para uma ingestão alimentar diária por animal significativamente reduzida dos grupos 15D, 45D e 60D, quando comparados ao grupo controle. O peso corporal ao final do experimento foi significativamente reduzido em todos os tempos de exposição à fumaça de cigarro (7D, 15D, 30D, 45D e 60D) quando comparados ao grupo controle. Houve redução no índice de adiposidade, no tempo de 60D, com redução na área adipocitária em 45D. O conteúdo da DCF apontou para aumento significativo nos tempos de 45D e 60D, quando comparado ao grupo controle. Ainda, avaliou-se os níveis proteicos e de fosforilação de algumas proteínas metabólicas no tecido adiposo periepídidimo. Nossos achados apontaram para um aumento significativo nos níveis de fosforilação da PKA, níveis proteicos da CGI-58 e de fosforilação da HSL^{Ser660} nos tempos de 15D, 30D, 45D, 60D. (Figuras 4, 5, 6).

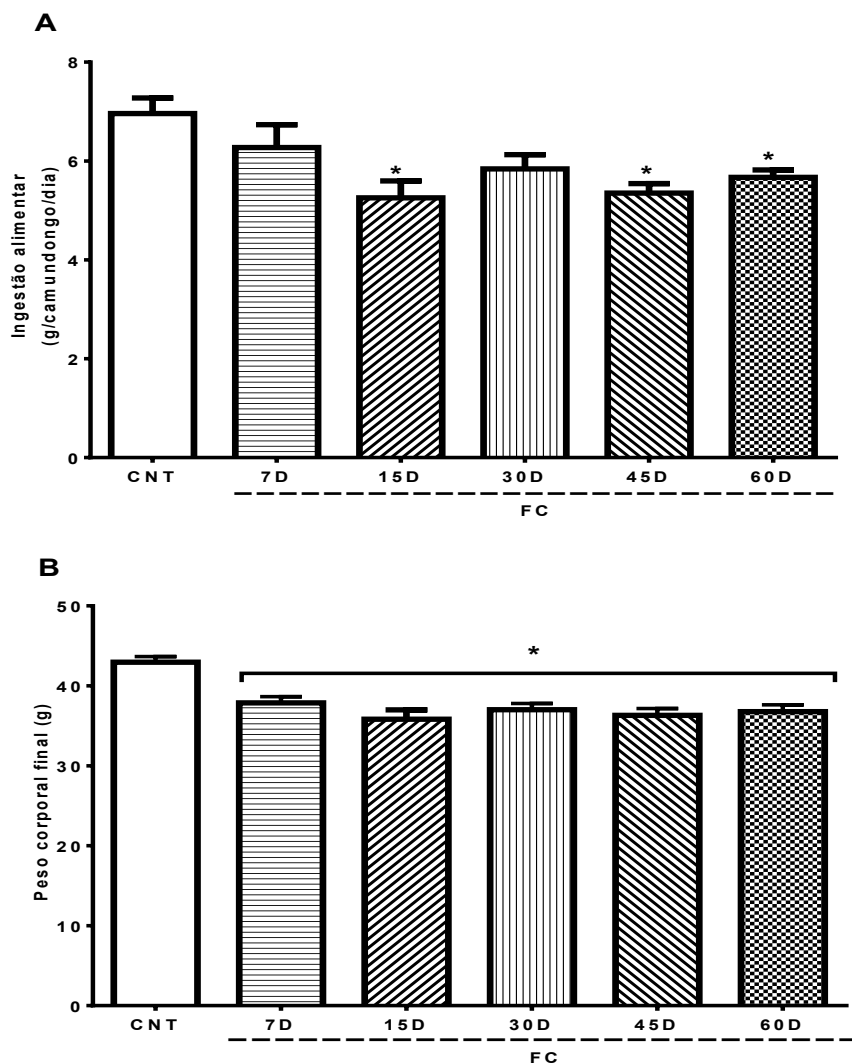


Figura 4. Efeitos metabólicos em camundongos magros expostos à fumaça de cigarro. A) Ingestão diária B) Peso corporal final. Foi utilizado o teste Anova One Way seguido pelo pós teste de Tukey. Os valores expressos estão representados por média e erro padrão da média. * $p < 0,05$ vs CNT. A, B, (n=10); CNT (controle) D (dias); FC (fumaça de cigarro).

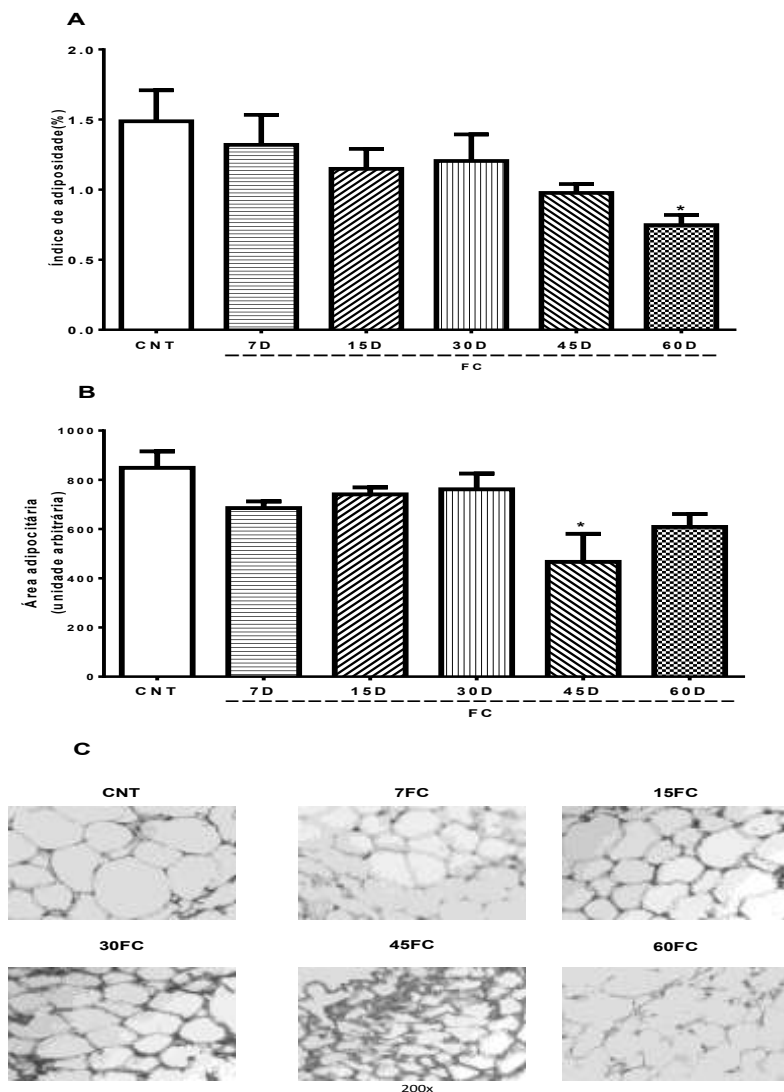


Figura 5. Efeitos metabólicos em camundongos magros expostos à fumaça de cigarro. A) Índice de adiposidade B) Área adipocitária C) Imagens representativas da área adipocitária. Foi utilizado o teste Anova One Way seguido pelo pós teste de Tukey. Os valores expressos estão representados por média e erro padrão da média. * $p < 0,05$ vs CNT. A, B (n=10); C (n=4). **CNT** (controle) **D** (dias); **FC** (fumaça de cigarro).

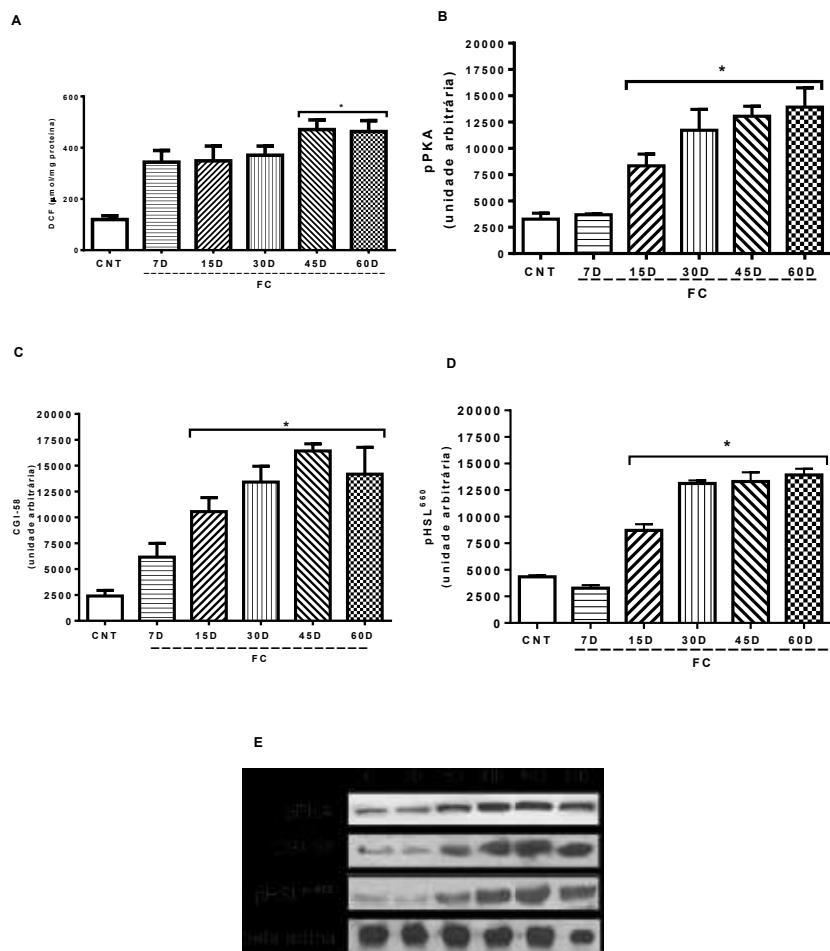


Figura 6. Efeitos metabólicos e moleculares em camundongos magros expostos à fumaça de cigarro. **A)** Níveis de oxidação por DCFH **B)** Níveis proteicos da pPKA **C)** Níveis proteicos CGI-58 **D)** Níveis proteicos da pHSL^{Ser660}. **E)** Bandas representativas das moléculas. Foi utilizado o teste Anova One Way seguido pelo pós teste de Tukey. Os valores expressos estão representados por média e erro padrão da média. * $p < 0,05$ vs CNT. A,B,C,D (n=5). **CGI-58** (gene de identificação comparativa 58); **CNT** (controle) **D)** (dias); **FC** (fumaça de cigarro); **pHSL^{Ser660}** (lipase hormônio sensível fosforilada em serina 660). **pPKA** (proteína kinase A).

4.2. Efeitos da exposição de camundongos magros à fumaça de cigarro suplementados com NAC

Uma vez observado que à fumaça de cigarro causou as maiores alterações metabólicas e moleculares no tempo de 45D, como no caso das espécies reativas e na enzima chave da lipólise (HSL), e que a formação de espécies reativas pode participar desse processo, decidiu-se por utilizar a NAC para melhor provar tal hipótese. Os achados apontaram para uma ingestão alimentar significativamente menor no grupo exposto à fumaça de cigarro e mesmo no tratado com NAC quando comparado ao grupo controle. O peso corporal final foi reduzido tanto no grupo exposto à fumaça de cigarro, quanto no grupo suplementado com NAC. O índice de adiposidade, nem mesmo a área adipocitária apresentaram mudança significativa quando comparado ao controle. O conteúdo das espécies reativas em animais expostos à fumaça de cigarro, quando suplementados com NAC foi revertido, ou seja, diminuiu. Da mesma forma, o conteúdo proteico da pPKA reduziu significativamente quando da suplementação com NAC, comparado ao grupo exposto à fumaça de cigarro. Achados semelhantes foram atribuídos ao conteúdo proteico da CGI-58, onde animais expostos à fumaça de cigarro, apresentaram um aumento significativo da referida proteína, porém redução significativa naqueles suplementados com NAC. A suplementação com NAC reduziu significativamente a fosforilação da pHSL^{Ser660}. (Figuras 7, 8, 9). No entanto, pode-se observar que a suplementação com NAC não reverte adiposidade.

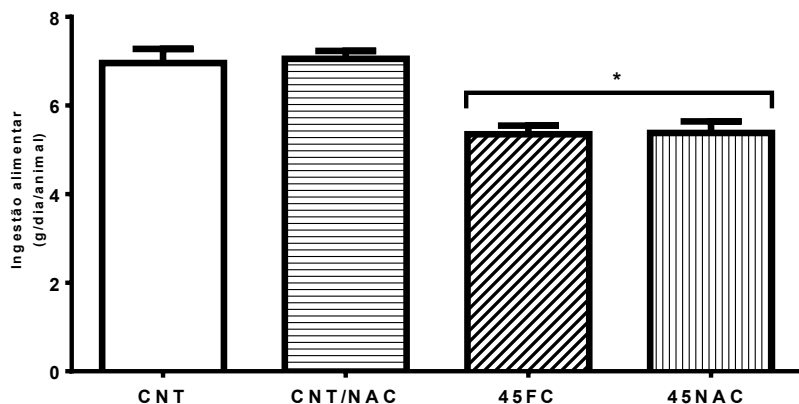
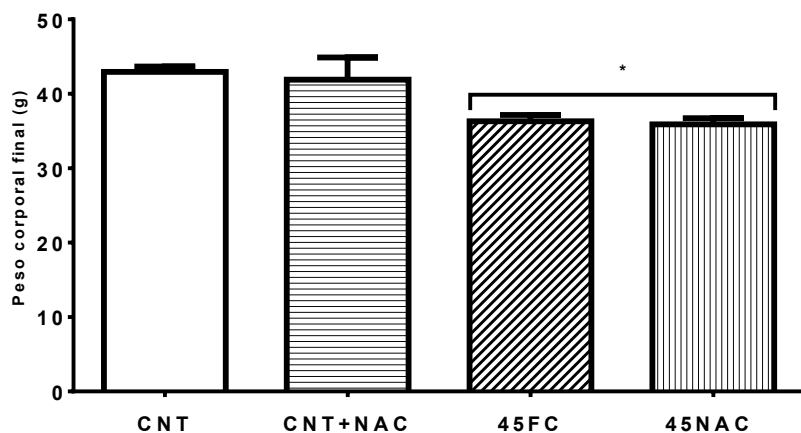
A**B**

Figura 7. Efeitos metabólicos em camundongos magros expostos à fumaça de cigarro tratados com NAC. A) Ingestão diária B) Peso corporal final. Foi utilizado o teste Anova One Way seguido pelo pós teste de Tukey. Os valores expressos estão representados por média e erro padrão da média. * $p < 0,05$ vs CNT; A, B, (n=10); **CNT** (controle); **CNT/NAC** (controle + N-acetilcisteína); **45FC** (exposição à fumaça de cigarro durante 45 dias); **45FC+NAC** (exposição à fumaça de cigarro e suplementação com NAC por 45 dias).

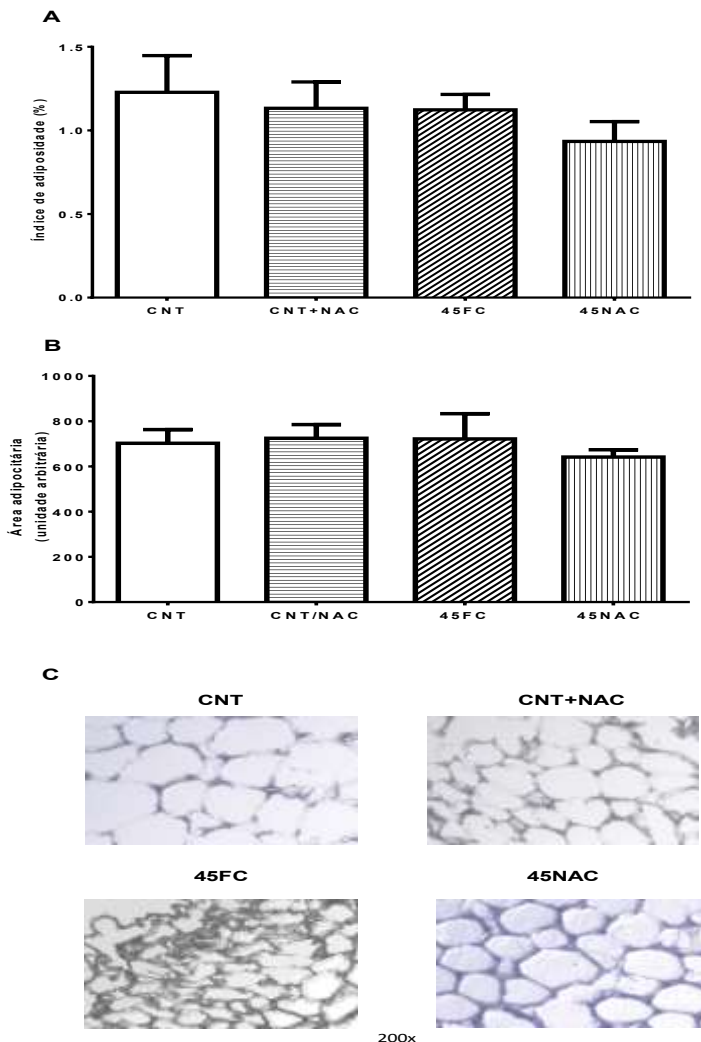


Figura 8. Efeitos metabólicos em camundongos magros expostos à fumaça de cigarro tratados com NAC. A) Índice de adiposidade B) Área adipocitária C) Imagens representativas da área adipocitária. Foi utilizado o teste Anova One Way seguido pelo pós teste de Tukey. Os valores expressos estão representados por média e erro padrão da média. A, B (n=10); C (n=4); **CNT** (controle); **CNT/NAC** (controle + N-acetilcisteína); **45FC** (exposição à fumaça de cigarro durante 45 dias); **45FC+NAC** (exposição à fumaça de cigarro e suplementação com NAC por 45 dias).

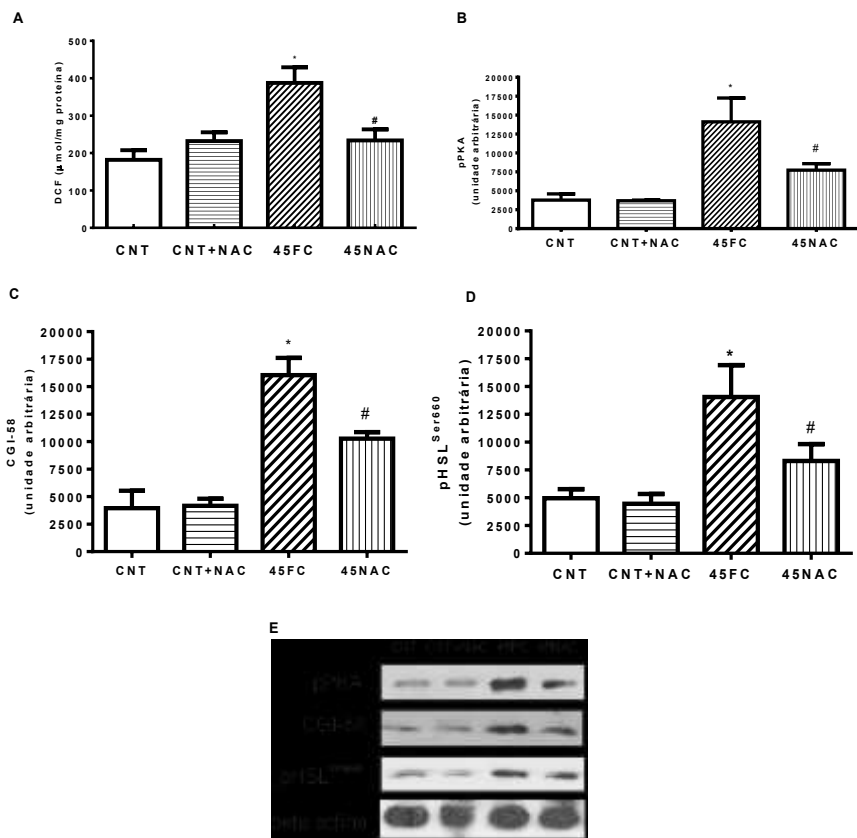


Figura 9. Efeitos metabólicos e moleculares em camundongos magros expostos à fumaça de cigarro tratados com NAC. **A)** Níveis de oxidação por DCFH **B)** Níveis proteicos da pPKA **C)** Níveis proteicos CGI-58 **D)** Níveis proteicos da pHSL^{Ser660}. **E)** Bandas representativas das moléculas. Foi utilizado o teste Anova One Way seguido pelo pós teste de Tukey. Os valores expressos estão representados por média e erro padrão da média. * $p < 0,05$ vs CNT; # $p < 0,05$ vs 45FC. A, B, C, D E (n=5). **CGI-58** (gene de identificação comparativa 58); **CNT** (controle); **CNT/NAC** (controle + N-acetilcisteína); **pHSL^{Ser660}** (lipase hormônio sensível fosforilada em serina 660); **pPKA** (proteína quinase A); **45FC** (exposição à fumaça de cigarro durante 45 dias); **45FC+NAC** (exposição à fumaça de cigarro e suplementação com NAC por 45 dias).

4.3. Efeitos da cessação à fumaça de cigarro

Sabe-se que a cessação do cigarro aumenta o peso corporal, mas o mecanismo envolvido neste processo não está totalmente claro. No presente estudo, hipotetizou-se que a cessação a fumaça de cigarro poderia reduzir as espécies reativas e assim reverter os processos observados até então. A ingestão diária de ração padrão e o peso corporal final aumentaram significativamente quando comparado ao grupo exposto à fumaça de cigarro (45FC). O índice de adiposidade aumentou nos tempos de 15D, 30D e 45D de cessação quando comparado ao 45FC. O maior tempo de cessação, ou seja 45D fez o índice de adiposidade retornar ao patamar dos camundongos não expostos (CNT). Houve aumento da área adipocitária nos tempos de cessação 30D e 45D, quando comparado ao 45FC. Da mesma forma o conteúdo das espécies reativas diminuiu nos grupos de cessação (7D, 30D, 45D). Os níveis proteicos da pPKA, CGI-58e pHSL^{ser660} foram reduzidos no tempo de cessação de 15D, 30D e 45D quando comparado ao grupo exposto (45FC) (Figura 10, 11, 12).

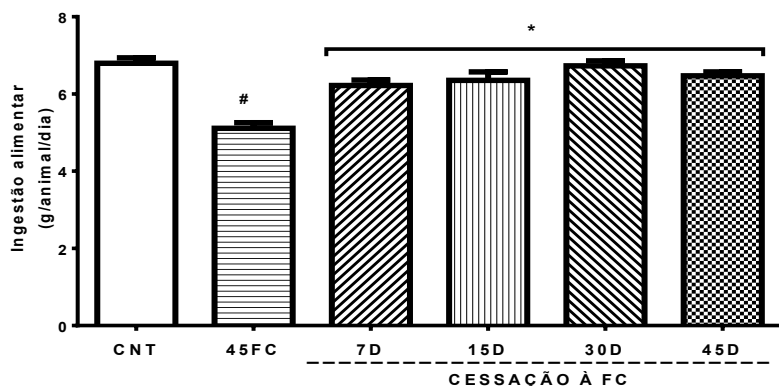
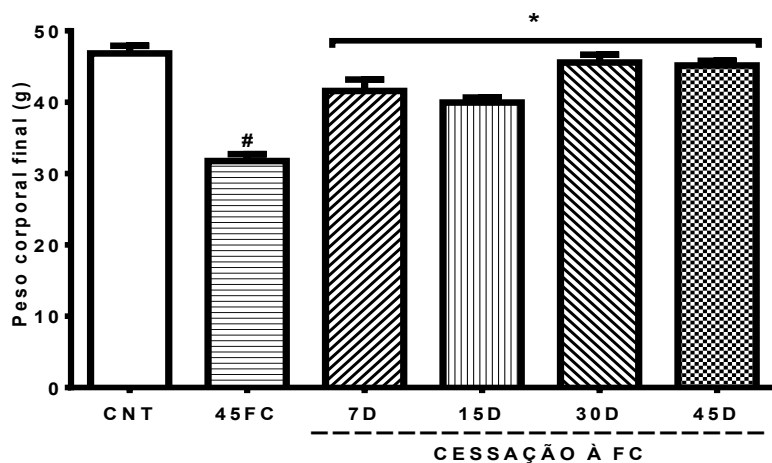
A**B**

Figura 10. Efeitos metabólicos em camundongos magros na cessação à fumaça de cigarro. A) Ingestão diária B) Peso corporal final. Foi utilizado o teste Anova One Way seguido pelo pós teste de Tukey. Os valores expressos estão representados por média e erro padrão da média. * $p < 0,05$ vs 45FC; # $p < 0,05$ vs CNT. A, B, (n=10); **CNT** (controle); **D** (dias); **FC** (fumaça de cigarro); **45FC** (exposição à fumaça de cigarro durante 45 dias);

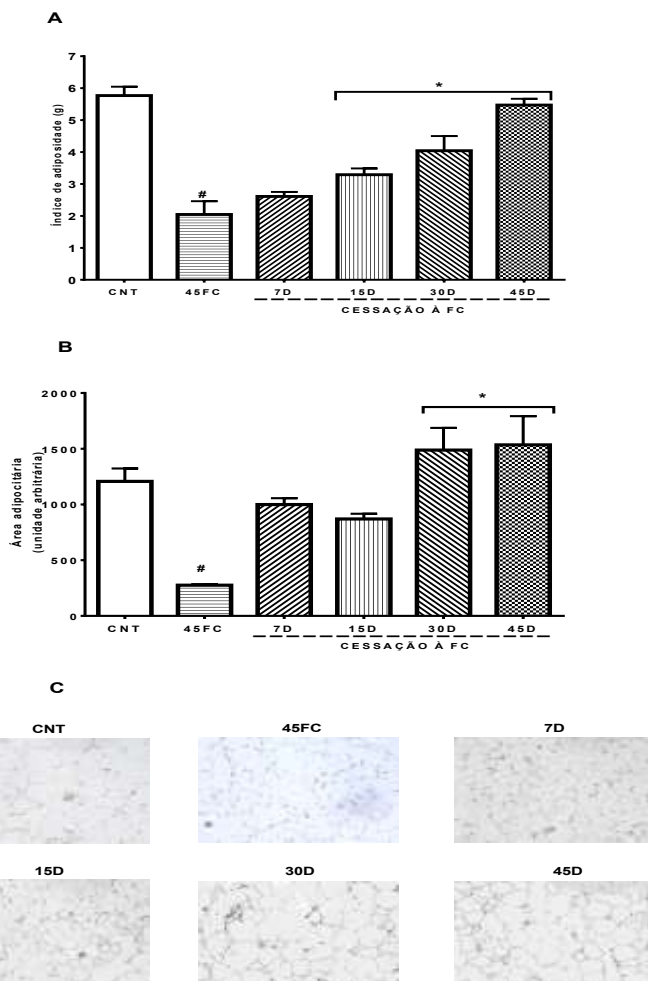


Figura 11. Efeitos metabólicos em camundongos magros na cessação à fumaça de cigarro. A) Índice de adiposidade B) Área adipocitária C) Imagens representativas da área adipocitária Foi utilizado o teste Anova One Way seguido pelo pós teste de Tukey. Os valores expressos estão representados por média e erro padrão da média. * $p < 0,05$ vs 45FC; # $p < 0,05$ vs CNT. A, B, C (n=4); **CNT** (controle); **D** (dias); **FC** (fumaça de cigarro); **45FC** (exposição à fumaça de cigarro durante 45 dias).

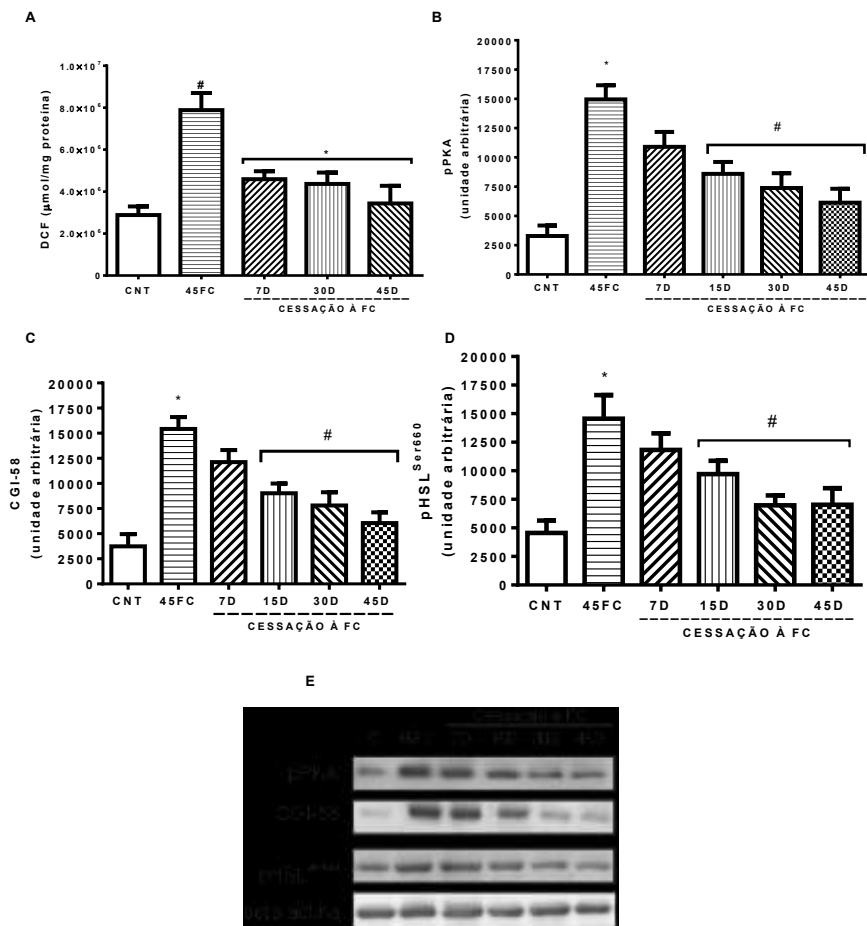


Figura 12. Efeitos metabólicos e moleculares em camundongos magros na cessação à fumaça de cigarro. **A)** Níveis de oxidação por DCFH **B)** Níveis proteicos da pPKA **C)** Níveis proteicos CGI-58 **D)** Níveis proteicos da pHSL^{Ser660}. **E)** Bandas representativas das moléculas. Foi utilizado o teste Anova One Way seguido pelo pós teste de Tukey. Os valores expressos estão representados por média e erro padrão da média. * $p < 0,05$ vs CNT; # $p < 0,05$ vs 45FC. A (n=5); B, C, D, E (n=4) **CNT** (controle); **D** (dias); **FC** (fumaça de cigarro); **45FC** (exposição à fumaça de cigarro durante 45 dias); **CGI-58** (gene de identificação comparativa-58); **pHSL^{Ser660}** (lipase hormônio sensível fosforilada em serina 660). **pPKA** (proteína kinase A).

4.4. Efeitos da exposição à fumaça de cigarro de camundongos obesos, suplementados com NAC ou seguidos por igual período de cessação

Esta etapa do trabalho teve como objetivo avaliar os parâmetros metabólicos e moleculares em camundongos obesos por dieta hiperlipídica (DH), expostos à fumaça de cigarro (FC), suplementados com antioxidante (NAC) e na cessação (CESS). A ingestão alimentar e o peso corporal foram significativamente menores nos grupos FC e NAC. Ambas as variáveis foram revertidas na CESS. O índice de adiposidade e a área adipocitária se mantiveram sem alterações significativas. A suplementação com NAC reduziu significativamente o conteúdo das espécies reativas, avaliadas por DCF, conteúdo este que não foi determinado no grupo CESS devido a questões técnicas e de manipulação da amostra. Por outro lado, os níveis de fosforilação da PKA e da HSL^{Ser660}, bem como os níveis proteicos da CGI-58 foram significativamente aumentados nos animais obesos (DH) e naqueles obesos expostos à fumaça de cigarro (FC), enquanto que naqueles suplementados com NAC, bem como na cessação (CESS), ocorreu redução significativa. (Figura 13, 14, 15).

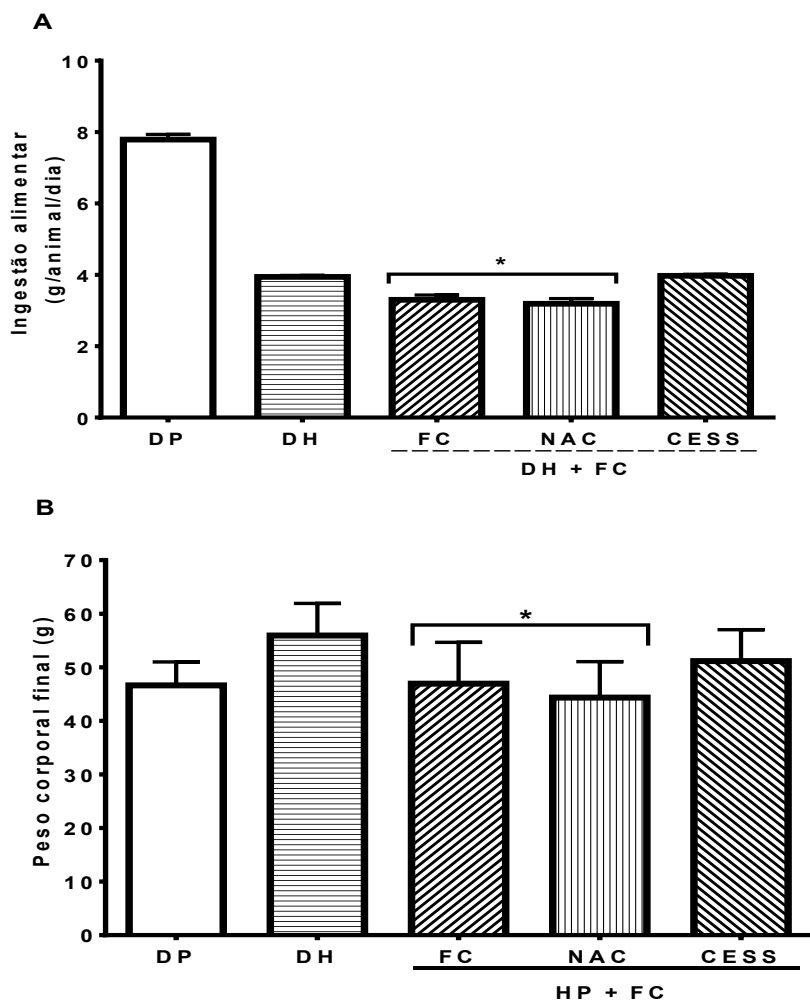


Figura 13. Efeitos metabólicos em camundongos obesos expostos à fumaça de cigarro tratados com NAC e na cessação. A) Ingestão diária de ração hiperlipídica **B)** Peso corporal final. Foi utilizado o teste Anova One Way seguido pelo pós teste de Tukey. Os valores expressos estão representados por média e desvio padrão da média. * $p < 0,05$ vs DH. A, B, (n=10); **DP** (dieta padrão); **DH** (dieta hiperlipídica); **FC** (dieta hiperlipídica + fumaça de cigarro); **NAC** (dieta hiperlipídica + fumaça de cigarro + N-acetilcisteína); **CESS** (dieta hiperlipídica + cessação à fumaça de cigarro).

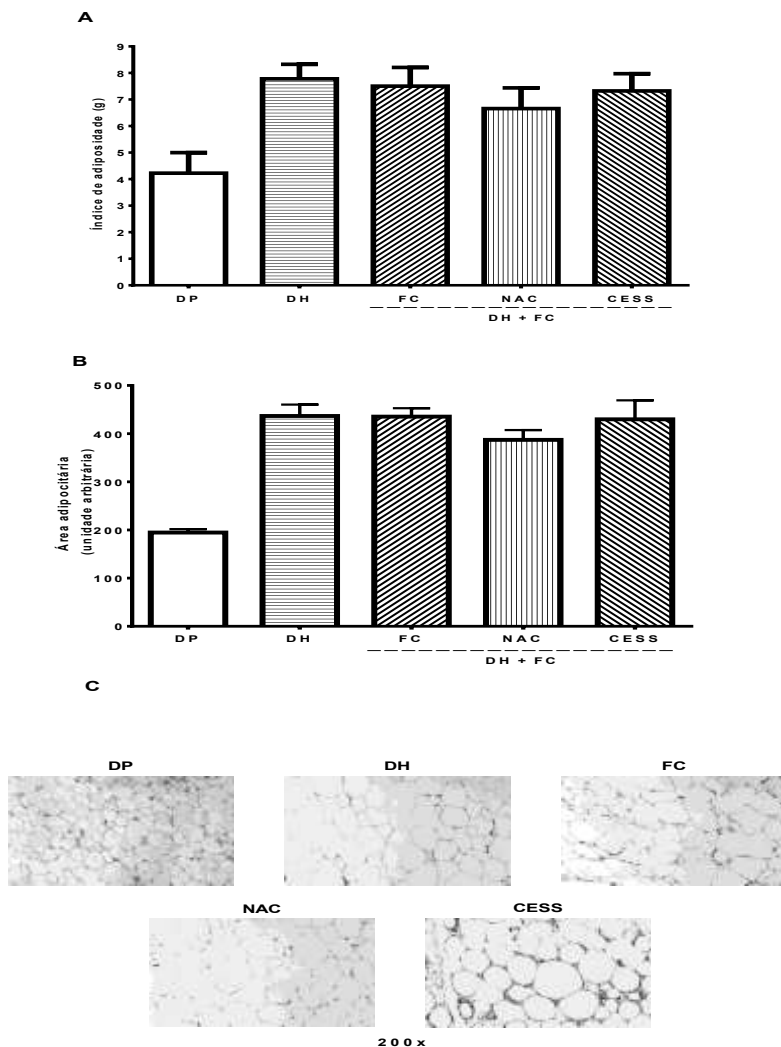


Figura 14. Efeitos metabólicos em camundongos obesos expostos à fumaça de cigarro tratados com NAC e na cessação. **A)** Índice de adiposidade **B)** Área adipocitária **C)** Imagens representativas da área adipocitária. Foi utilizado o teste Anova One Way seguido pelo pós teste de Tukey. Os valores expressos estão representados por média e desvio padrão da média. A, B (n=10); C (n=4); **DP** (dieta padrão); **DH** (dieta hiperlipídica); **FC** (dieta hiperlipídica + fumaça de cigarro); **NAC** (dieta hiperlipídica + fumaça de cigarro + N-acetilcisteína); **CESS** (dieta hiperlipídica + cessação à fumaça de cigarro).

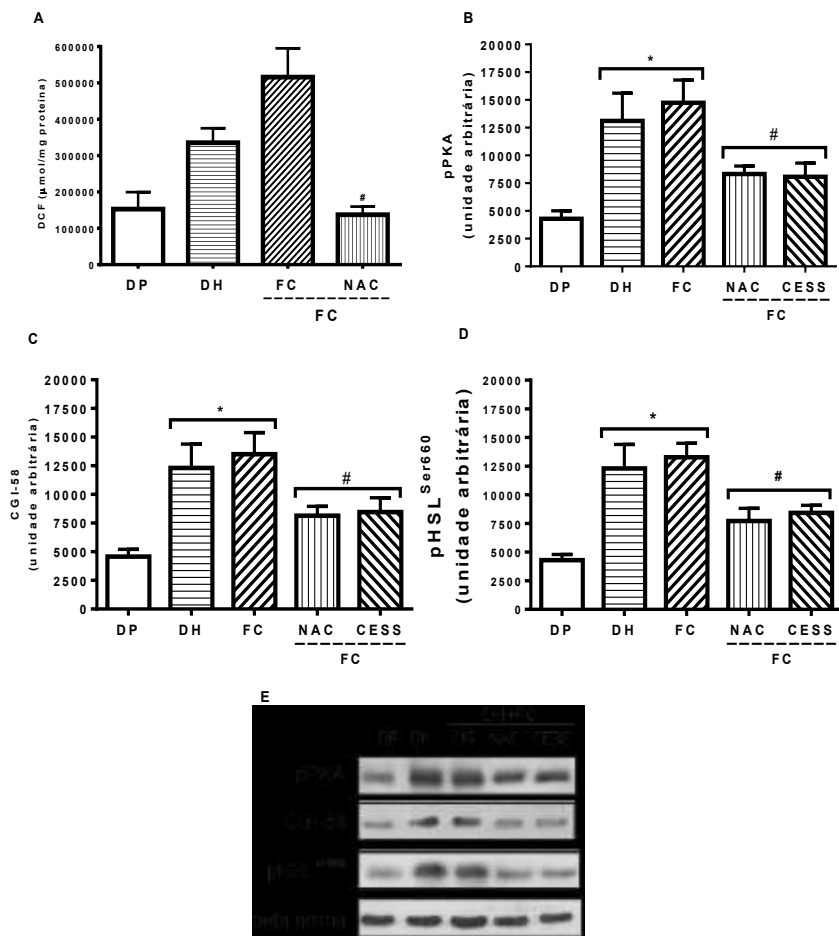


Figura 15. Efeitos metabólicos e moleculares em camundongos obesos expostos à fumaça de cigarro tratados com NAC e na cessação. **A)** Níveis de oxidação por DCFH **B)** Níveis proteicos da pPKA **C)** Níveis proteicos CGI-58 **D)** Níveis proteicos da pHS�^{Ser660}. **E)** Bandas representativas das moléculas. Foi utilizado o teste Anova One Way seguido pelo pós teste de Tukey. Os valores expressos estão representados por média e desvio padrão da média. * $p < 0,05$ vs DP; # $p < 0,05$ vs FC. A, B, C, D, E (n=5). **DP** (dieta padrão); **DH** (dieta hiperlipídica); **FC e/ou CIG** (dieta hiperlipídica + fumaça de cigarro); **NAC** (dieta hiperlipídica + fumaça de cigarro + N-acetilcisteína); **CGI-58** (gene de identificação comparativa 58); **pHS�^{Ser660}** (lipase hormônio sensível fosforilada em serina 660); **pPKA** (proteína kinase A).

5 DISCUSSÃO

A obesidade é uma doença de incidência e prevalência marcante em todo o mundo, considerada um dos principais problemas de saúde pública. Atualmente as iniciativas terapêuticas não têm demonstrado ser tão promissoras e novas descobertas se fazem necessárias. Dessa forma o atual projeto procurou investigar a possibilidade da fumaça de cigarro alterar a adiposidade corporal. Para tanto, foi utilizado, em todas as etapas do presente estudo o modelo animal de exposição à fumaça de cigarro, tanto magros quanto obesos, suplementado com NAC ou submetidos a cessação. Os principais resultados encontrados foram: redução do peso corporal em animais expostos à fumaça de cigarro, desde o menor ao maior tempo de exposição, associado à uma redução significativa na ingestão alimentar em todos os tempos de exposição. Observou-se, também, redução na adiposidade e na área adipocitária do tecido adiposo periepídidimo. Nestes mesmos animais, a exposição à fumaça de cigarro alterou de maneira significativa o conteúdo das espécies reativas no tecido adiposo periepídidimo. Em animais expostos à fumaça de cigarro, suplementados com NAC, ocorreu redução da ingestão alimentar, no peso corporal, nos níveis de DCF, na fosforilação PKA, HSL e níveis de CGI-58. O índice de adiposidade e área adipocitária não sofreram alterações no grupo suplementado com NAC. Na cessação à fumaça de cigarro, ocorreu um aumento na ingestão alimentar, no peso corporal, no índice de adiposidade, na área adipocitária, redução no conteúdo das espécies reativas, nos níveis proteicos da CGI-58 e de fosforilação da PKA e HSL ^{Ser660}.

Em outra etapa do presente estudo foi avaliado se a exposição à fumaça de cigarro em camundongos obesos poderia levar ao aumento das espécies reativas e se isto resultaria em aumento da lipólise. Os achados do presente estudo nesta etapa, apontaram para redução na ingestão alimentar e peso corporal em camundongos obesos expostos à fumaça de cigarro (FC), suplementados com N-acetilcisteína (NAC), variáveis que foram revertidas na cessação (CESS), quando comparado ao controle (DH); índice de adiposidade e área adipocitária sem alterações; aumento das espécies reativas nos animais obesos, sendo mais acentuado nos animais expostos à fumaça de cigarro, com redução significativa quando da suplementação com NAC e na

cessação. Este aumento das espécies reativas em camundongos obesos expostos à fumaça de cigarro pela avaliação do DCF, sugere a participação direta destes elementos sobre o metabolismo do tecido adiposo. As moléculas envolvidas na lipólise como a pPKA, CGI-58 e pHSL^{Ser660}, tiveram seus níveis aumentados em animais alimentados com dieta hiperlipídica e na exposição à fumaça de cigarro, com redução significativa na suplementação com NAC e na cessação.

Estudos utilizando modelos animais em que a nicotina foi administrada mostraram que os animais perdiam peso corporal (Grunberg et al., 1986; Bishop et al., 2002; Bellinger et al., 2003), no entanto, no presente estudo não podemos descartar a participação de outros constituintes presentes na fumaça de cigarro. No presente estudo também observou-se redução do peso corporal em animais expostos à fumaça de cigarro, mas não pode-se excluir o padrão alimentar como possível mecanismo dessa redução de peso, uma vez que os animais apresentaram redução significativa na ingestão alimentar. Em um estudo realizado por Miyata (2001), a nicotina diminuiu significativamente o peso corporal e a ingestão alimentar através da diminuição do tamanho da refeição e um maior intervalo entre as refeições em ratos fêmeas *Fisher*. No presente estudo, além da redução na ingestão alimentar e do peso corporal em animais expostos à fumaça de cigarro, ocorreu uma reversão da adiposidade e área adipocitária na cessação, principalmente nos maiores períodos. Por outro lado, a exposição à fumaça de cigarro alterou de maneira significativa o conteúdo das espécies reativas, no tecido adiposo periepididimal. Expondo camundongos a 9 cigarros diários, Raza et al., (2013) verificaram aumento na produção de ERO no tecido adiposo mesentérico de animais expostos à fumaça de cigarro em relação aos camundongos não expostos. Chen et al., (2007) demonstraram que o acúmulo de ERO está envolvido em vários processos fisiologicamente importantes, dentre os quais talvez esteja a atividade lipolítica no tecido adiposo. Uma análise de tomografia computadorizada para distribuição de gordura, mostrou que a nicotina reduziu eficazmente a gordura abdominal em camundongos que consumiram uma dieta hiperlipídica, resultando em menor gordura visceral, achados estes que estão em acordo em camundongos magros, mas não quando utilizamos camundongos obesos. Em outro estudo, o efeito da

nicotina sobre a perda de peso em camundongos tratados com dieta hiperlipídica foi completamente bloqueado pela mecamilamina, um antagonista não seletivo dos receptores acetilcolínico nicotínicos (nAChR), mas foi apenas parcialmente bloqueada pela vareniclina, um agonista/antagonista parcial dos receptores acetilcolínico nicotínico $\alpha 4\beta 2$, uma droga conhecida como Chanpix que é usada atualmente na clínica para a cessação do tabagismo (Mangubat et al., 2012).

No estudo realizado por Ypsilantis et al., (2013), a ingestão alimentar em ratos expostos à fumaça de cigarro reduziu significativamente, retornando aos níveis controle após a quarta semana de cessação. O mesmo estudo ainda mostrou uma forte e brusca redução do peso corporal nas 4 primeiras semanas de exposição à fumaça de cigarro. Interessantemente, a ingestão alimentar após substancial declínio na primeira semana retornou aos níveis controle, diminuindo o papel da ingestão calórica e sugerindo uma elevação no gasto energético. Estas evidências tanto de estudos clínicos quanto animais mostram a ação simpatomimética da nicotina, que aumenta o gasto energético (Hofstetter, et al, 1986; Chen et al., 2007; Audrian-McGovern e Benowitz, 2011;).

Estudos têm mostrado que as espécies reativas em concentrações fisiológicas desempenham funções celulares importantes, as quais medeiam ativação da cascata de sinalização para o crescimento, diferenciação, proliferação e apoptose (Allen e Tresini, 2000; Dröge, 2002; Ji, 2007). As espécies reativas estão envolvidas na regulação da lipólise quando da exposição à fumaça de cigarro (Wolfe et al., 1987; Campbell et al., 1994; Talior et al., 2003; Furukawa et al., 2004; D'Autreaux et al., 2007). Na obesidade, há aumento no conteúdo das espécies reativas no tecido adiposo, devido ao aumento de agentes inflamatórios e o consumo alimentar excessivo. Como consequência ao aumento de espécies reativas, ocorre a fosforilação e ativação da pPKA e da HSL^{Ser552}, o que resulta em aumento da lipólise. Por outro lado, o uso de antioxidantes como a N-acetilcisteína (NAC), difenilodonina (DPI) e o resveratrol anulam este efeito (Krawczyk et al., 2012). Porém, o envolvimento das espécies reativas no metabolismo lipídico não está totalmente elucidado, muito menos na exposição a fumaça de cigarro.

Sabe-se que a cessação do cigarro aumenta o peso corporal, mas o mecanismo envolvido neste processo não está claro. De acordo com Stamford et al., (1986) a cessação do tabagismo aumenta significativamente o consumo médio diário de calorias (227kcal), que foi responsável por 69% no ganho de peso em mulheres após 48 dias de cessação. No entanto, Chirico et al., (1987), verificaram que abstinentes de cigarro, não consumiram mais calorias durante 8 semanas, apesar de ganhar 1,4 kg de peso corporal, apontando que alterações metabólicas podem estar acontecendo que não somente o controle da ingestão alimentar. Considerando achados da literatura, a etapa seguinte do presente estudo foi caracterizada pela cessação à fumaça de cigarro. Pode-se observar aumento da ingestão alimentar, no peso corporal, no índice de adiposidade, e na área adipocitária, bem como redução do conteúdo das espécies reativas. Assim sugere-se que, um dos fatores contribuintes no ganho de peso na cessação, pode estar relacionado à mudança no metabolismo do tecido adiposo. Linhas convergentes de evidências suportam a noção de que o ganho de peso corporal após a cessação ao cigarro inclui ingestão calórica aumentada e taxa metabólica diminuída (Moffatt e Owens, 1991; Ferrara et al., 2001; Filozof et al., 2004; Audrain-McGovern e Benowitz, 2011).

Ainda, Ypsilantis et al., (2013) verificaram que após a cessação do tabagismo o peso corporal não excedeu ao peso dos animais controle, suportando o fato de que ex fumantes tendem a retornar aos níveis de pessoas as quais nunca fumaram (Williamson et al., 1991). Por outro lado, o tabagismo está associado com uma piora na adiposidade visceral, independente das mudanças no IMC, o que de certa forma ajuda a explicar o paradoxo do risco metabólico aumentado, associado com a adiposidade visceral, apesar da perda de peso total (Onat et al., 2007). Este achado se assemelha ao do presente estudo, onde animais obesos expostos à fumaça de cigarro apresentaram maior aumento percentual da gordura mesentérica quando comparada à periepídidimal, perirenal e retroperitoneal (dados não mostrados).

Fumantes em média pesam 4-5 kg menos do que não fumantes e quando cessam o tabagismo ganham em média 4,5 kg num período de 6-12 meses, e seu peso retorna a mesma trajetória peso/idade igualmente aos dos não fumantes (Audrain McGovern e Benowitz, 2011). Porém, alguns fumantes ganham

mais peso ao cessar o cigarro, sendo que 13% ganham mais de 10kg (Williamson et al., 1991). Indivíduos que cessaram o cigarro com sucesso normalmente ganham entre 7 a 10 kg em um período de 8 anos de cessação, enquanto aqueles que continuaram a fumar em média ganham 4 a 5 kg (O'Hara et al, 1998; Lycett et al 2011).

A oxidação das gorduras pode ser um importante fator lipostático que regula o balanço energético (Schutz, 1992). A oxidação de gordura por quilograma de massa magra foi correlacionada positivamente com uma excreção de 24h de nicotina, indicando que fumantes com alta absorção de nicotina utilizam mais lipídios para sustentar o gasto energético de jejum quando comparado a não fumantes, (Stamford et al, 1986; Perkins et al, 1989; Jansen et al., 1995; Ferrara et al, 2001).

A obesidade está relacionada ao aumento na produção de espécies reativas e isso resulta em alterações no metabolismo celular (Furukawa et al., 2004). Assim, buscou-se avaliar se a exposição à fumaça de cigarro em camundongos obesos poderia levar ao aumento das espécies reativas e se isto resultaria em aumento da dos níveis proteicos e de fosforilação de proteínas chave da lipólise, bem como, demonstrar os mecanismos pelos quais este processo ocorre. Os resultados apontaram para um aumento das espécies reativas nos animais obesos, sendo mais acentuado nos animais expostos à fumaça de cigarro, com redução quando da suplementação da NAC. Este aumento das espécies reativas em camundongos obesos expostos à fumaça de cigarro sugere a participação direta das espécies reativas sobre o metabolismo do tecido adiposo.

A atividade lipolítica é fortemente regulada por fatores hormonais e nutricionais. Os principais reguladores positivos da lipólise são as catecolaminas e peptídeos natriuréticos (NPS)(Nielsen et al., 2014). Considerando o exposto, nós avaliamos o conteúdo das moléculas da cascata lipolítica do tecido adiposo periepídimo de camundongos obesos expostos à fumaça de cigarro suplementados com NAC, na cessação, especialmente tendo como alvo a regulação molecular de uma das principais lipases, a pHS^{Ser660}, a pPKA, e a CGI-58. Os resultados em camundongos expostos à fumaça de cigarro apontaram para um aumento significativo da fosforilação da PKA nos grupos de 15D, 30D, 45D e 60D. Quando da suplementação com NAC ocorreu uma redução significativa nos níveis de

fosforilação da PKA. O mesmo ocorreu na cessação. A ativação da PKA também pode ser mediada pelas espécies reativas, visto que o uso do antioxidante reduz os níveis de fosforilação e leva a menor ação de algumas enzimas envolvidas no evento lipolítico. Em um estudo realizado por Alberdi et al., (2011), no qual foi utilizado o resveratrol como antioxidante, houve redução do tecido adiposo, esta redução foi atribuída a um incremento na fosforilação da PKA.

Em adipócitos sem estímulos lipolíticos, CGI-58 liga-se fortemente a gotículas de lipídios, interagindo com perilipina A (Zechner et al, 2009). Contudo, a CGI-58 se dissocia da perilipina quando de uma estimulação lipolítica pela ativação dos receptores β -adrenérgicos, que causa um aumento no monofosfato de adenosina cíclico e consequente ativação da proteína quinase A (PKA). Este processo libera CGI-58 para associar-se a ATGL. No presente estudo, os níveis de CGI-58 nos animais magros expostos à fumaça de cigarro foram aumentados em relação aos controle, com redução significativa nos grupos expostos à fumaça de cigarro suplementados com NAC e na cessação, com achados semelhantes no grupo de animais obesos.

Os resultados do presente estudo apontaram para um aumento dos níveis da pHSL^{Ser660}, nos camundongos magros expostos à fumaça de cigarro. No entanto a suplementação com NAC e a cessação reduziram significativamente a ativação da pHSL^{Ser660}. Em camundongos obesos houve aumento significativo naqueles expostos à fumaça de cigarro, redução nos suplementados com NAC e na cessação. Em camundongos a ativação de HSL está relacionada com a fosforilação da PKA em resíduos regulatórios específicos de serina como Ser⁵⁶³, Ser⁶⁵⁹ e Ser⁶⁶⁰ (Stralfors et al., 1985; Garton et al., 1990; Anthonsen et al., 1998) correspondendo aos resíduos humanos da Ser⁵⁵², Ser⁶⁴⁹, Ser⁶⁵⁰ (Contreras et al., 1998; Watt et al., 2007), o que aponta para o envolvimento destas proteínas na lipólise, mediado pelas espécies reativas, uma vez que o antioxidante reduz sua ativação.

Diversos estudos dentre os quais o estudo de Mineur et al., (2011), apontam para o fato de que a fumaça de cigarro tem seus efeitos sobre o sistema nervoso central, que aumenta o gasto energético, inibe a fome, aumenta a lipólise e diminui o peso corporal. Por outro lado, resultados de outros estudos são

conflitantes, quando analisados os efeitos diretos da fumaça de cigarro sobre os tecidos periféricos, especialmente sobre o tecido adiposo. Os seus mecanismos permanecem em parte desconhecidos. Neste sentido, estudos complementares em cultura de células poderiam apontar se as alterações metabólicas induzidas pela fumaça de cigarro ocorrem em função do envolvimento mais acentuado do sistema nervoso central ou periférico.

Os resultados do presente estudo, tomados em conjunto demonstram que a exposição à fumaça de cigarro de camundongos magros e obesos leva a ingestão alimentar reduzida, redução no peso corporal, bem como ativação das principais enzimas lipolíticas, sugerindo efeitos das espécies reativas neste processo, uma vez que a suplementação com NAC e a cessação revertem os achados.

6 CONCLUSÃO

A exposição à fumaça de cigarro em camundongos magros reduz a ingestão alimentar, o peso corporal, o índice de adiposidade e área adipocitária, aliados à níveis aumentados das espécies reativas e consequente aumento da pPKA, CGI-58, pHSL. A suplementação com NAC em camundongos magros expostos à fumaça de cigarro leva a redução na ingestão alimentar, no peso corporal, sem alterar o índice de adiposidade e a área adipocitária, bem como reduz a atividade das moléculas da cascata lipolítica e das espécies reativas. Na cessação à fumaça de cigarro ocorre aumento da ingestão alimentar, peso corporal, índice de adiposidade, área adipocitária, redução das espécies reativas e da pPKA, CGI-58 e pHSL^{ser660}. Em camundongos obesos, a exposição à fumaça de cigarro e a suplementação com NAC reduz a ingestão alimentar e peso corporal sem alterar de forma evidente o índice de adiposidade e área adipocitária. A cessação à fumaça de cigarro em camundongos obesos aumenta a ingestão alimentar e o peso corporal. Em animais obesos, a atividade da pPKA, CGI-58 e da pHSL sensivelmente aumenta na exposição à fumaça de cigarro e reduz com na suplementação com NAC, e na cessação. Os resultados tomados em conjunto sugerem que em camundongos magros e obesos a fumaça de cigarro desencadeia uma ação lipolítica, que parece ser modulada, pelo menos em parte, pelas espécies reativas.

REFERÊNCIAS

- Alberdi G, Rodríguez VM, Miranda J, Macarulla MT, Arias N, Andrés-Lacueva C, Portillo MP. Changes in white adipose tissue metabolism induced by resveratrol in rats. *Nutr Metab*. 2011 10;8(1):29.
- Albuquerque EX, Santos MD, Alkondon M, Pereira EF, Maelicke A. Modulation of nicotinic receptor activity in the central nervous system: a novel approach to the treatment of Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 2001 Aug;15 Suppl 1:S19-25.
- Allen RG, Tresini M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med*. 2000;28(3):463-99.
- An Z, Wang H, Song P, Zhang M, Geng X, Zou MH. Nicotine-induced activation of AMP-activated protein kinase inhibits fatty acid synthase in 3T3L1 adipocytes: a role for oxidant stress. *J Biol Chem*. 2007;282(37):26793-801.
- Andersson K, Arner P. Systemic nicotine stimulates human adipose tissue lipolysis through local cholinergic and catecholaminergic receptors. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2001; 25:1225–1232.
- Angelopoulou R, Lavranos G, Manolakou P. ROS in the aging male: Model diseases with ROS-related pathophysiology. *Reprod Toxicol*. 2009;28(2):167-71.
- Anthonsen MW, Ronnstrand L, Wernstedt C, Degerman E, & Holm C. Identification of novel phosphorylation sites in hormone-sensitive lipase that are phosphorylated in response to isoproterenol and govern activation properties in vitro. *J Biol Chem*. 1998; 273(1):215-221.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução RDC Nº 306, de 07 de dezembro de 2004. Disposição sobre o regulamento técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde.

Audrain-McGovern J, Benowitz NL. Cigarette smoking, nicotine, and body weight. *Clin Pharmacol Ther.* 2011;90(1):164-8.

Bellinger L, Cepeda-Benito A, Wellman PJ. Meal patterns in male rats during and after intermittent nicotine administration. *Pharmacol Biochem Behav* 2003;74:495–504.

Bellinger L , Wellman PJ, Harris RB, Kelso EW, Kramer PR. The effects of chronic nicotine on meal patterns, food intake, metabolism and body weight of male rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2010;95(1):92-9.

Bishop C, Parker GC, Coscina DV. Nicotine and its withdrawal alter feeding induced by paraventricular hypothalamic injections of neuropeptide Y in Sprague-Dawley rats. *Psychopharmacology.* 2002;162:265–72.

Bray GA. How do we get fat? An epidemiologic and metabolic approach. *Clin Dermatol.* 2004;22(4):281-8.

Brunk UT, Terman A. The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging: accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis. *Eur. J. Biochem.* 2002;(269); 1-7.

Buchwald H, Avidor Y, Braunwald E. Bariatric surgery: a systematic review meta-analysis. *JAMA.* 2004;292:1724-37.

Buchwald H, Estok R, Fahrenbach K, Banel D, Jensen MD, Pories WJ, Bantle JP, Sledge I. Weight and type 2 diabetes after bariatric surgery: systematic review and meta-analysis. *Am J Med.* 2009 Mar;122(3):248-256.e5.

Campbell PJ, Carlson MG, Nurjhan N. Fat metabolism in human obesity. *Am J Physiol.* 1994;266:E600-605.

Cancello R, Zulian A, Maestrini S et al., The nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ in subcutaneous mature adipocytes: downregulation in human obesity and modulation by diet-induced weight loss. *Int J Obes.* 2012;36:1552-1557.

Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev.* 2004; 84(1):277-359.

Chan HC, Kaetzel MA, Gotter AL, Dedman JR, Nelson DJ. Annexin IV inhibits calmodulin-dependent protein kinase II-activated chloride conductance. A novel mechanism for ion channel regulation. *J Biol Chem.* 1994. 23;269(51):32464-8.

Chen Y, McMillan-Ward E, Kong J, Israels SJ, Gibson SB. Mitochondrial electron-transport-chain inhibitors of complexes I and II induce autophagic cell death mediated by reactive oxygen species. *J Cell Sci.* 2007; 120(Pt 23):4155-66.

Chirico G, Locatelli F, Rondini G, Gasparoni A, Severi F, Ravagni F, Danesino V.

Effect of active and passive smoking on vascular reactivity in mothers and infants. *Lancet.* 1987 May 9;1(8541):1095-6.

Cho KJ, Seo JM, Kim JH. Bioactive lipoxygenase metabolites stimulation of NADPH oxidases and reactive oxygen species. *Mol Cells.* 2011;32(1):1-5.

Cintra DE, Ropelle ER, Pauli JR. Obesidade e diabetes: fisiopatologia e sinalização celular. São Paulo: Sarvier. 2011;74-102.

Contreras JA, Danielsson B, Johansson C, Osterlund T, Langin D, Holm C. Human hormone-sensitive lipase: expression and large-scale purification from a baculovirus/insect cell system. *Prot Exp and Purif.* 1998; 12 93-99.

D'Autreaux B, Toledano MB. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8:813–824.

De Souza CT, Araújo EP, Prada PO, Saad MJ, Boschero AC, Velloso LA. Short-term inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha expression reverses diet-induced diabetes mellitus and hepatic steatosis in mice. *Diabetologia.* 2005 Sep;48(9):1860-71.

Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Ver.* 2002;82(1): 47-95.

Echtay KS. Mitochondrial uncoupling proteins-What is their physiological role? *Free Radic Biol Med.* 2007;43(10): 1351-71.

Ezzati, M. Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19,2 milion participants. *Lancet.* 2016;387:1377-96.

Farombi EO, Ugwuezunmba MC, Ezenwadu TT, Oyeyemi MO, Ekor M. Tetracycline-induced reproductive toxicity in male rats: effects of vitamin C and N-acetylcysteine. *Exp Toxicol Pathol.* 2008;60(1):77-85.

Ferrara CM, Kumar M, Nicklas B, et al. Weight gain and adipose tissue metabolism after smoking cessation in women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001; 25:1322-1326

Filozof C, Ferna´ndez Pinilla MC, Ferna´ndez-Cruz A. Smoking cessation and weight gain. *Obes Rev.* 2004;5(2):95-103.

Fox CS, Massaro JM, Hoffmann U, Pou KM, Maurovich-Horvat P, Liu CY, Vasan RS, Murabito JM, Meigs JB, Cupples LA, D'Agostino RB Sr, O'Donnell CJ. Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation.* 2007;116(1):39-48.

Fredrikson G, Tornqvist H, Belfrage P. Hormone-sensitive lipase and monoacylglycerol lipase are both required for complete degradation of adipocyte triacylglycerol. *Biochim Biophys Acta.* 1986;876(2):288-293.

Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 2004;114(12):1752-61.

Garton AJ, Yeaman SJ. Identification and role of the basal phosphorylation site on hormone-sensitive lipase. *Eur. J. Biochem.* 1990; 191:245Y50.

Gochberg-Sarver A, Kedmi M, Gana-Weisz M et al Tnfalpha, Cox2 and AdipoQ adipokine gene expression levels are modulated in murine adipose tissues by both nicotine and nACh receptors containing the beta2 subunit. *Mol Genet Metab.* 2012;107:561–570.

Gruber A, Cornaciu I, Lass A, Schweiger M, Poeschl M, Eder C, Kumari M, Schoiswohl G, Wolinski H, Kohlwein SD, Zechner R, Zimmermann R, Oberer M. The N-terminal Region of Comparative Gene Identification-58 (CGI-58) Is Important for Lipid Droplet Binding and Activation of Adipose Triglyceride Lipase. *J. Biol Chem.* 2010; 285 (16):12289 –12298.

Grunberg NE. The effects of nicotine and cigarette smoking on food consumption and taste preferences. *Addict Behav.* 1982;7(4):317-31.

Grunberg NE, Bowen DJ, Winders SE. Effects of nicotine on body weight and food consumption in female rats. *Psychopharmacology.* 1986;90:101–5.

Halliwell B, Gutteridge J. Free radicals in biology and medicine. 4^a ed. New York: University Press. 2007.

Haslam DW, James WP. Obesity. *Lancet.* 2005;366(9492):1197-209.

Hofstetter A, Schutz Y, Jéquier E, Wahren J. Increased 24-hour energy expenditure in cigarette smokers. *N Engl J Med.* 1986 Jan 9;314(2):79-82.

Holm J, Hansen SI. Characterization of a High Affinity Folate Binding rotein in Porcine Serum: Ionic Charge, Concentration-Dependent Polymerization and Ligand Binding Mechanism. *Bioscience Reports.* 2004;23:339-351.

Jansen DF, Nedeljkovic S, Feskens EJ, Ostojic MC, Grujic MZ, Bloemberg BP, Kromhout D. Coffee consumption, alcohol use, and cigarette smoking as determinants of serum total and HDL cholesterol in two Serbian cohorts of the Seven Countries Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15(11):1793-7.

Ji LL. Antioxidant signaling in skeletal muscle: a brief review. *Exp Gerontol.* 2007;42(7):582-93.

Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena antioxidants redox reactions and methods for their quantification. *Toxicol Pathol.* 2002; 30(6):620-50.

Kolditz CI, Langin D. Adipose tissue lipolysis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2010;13(4):377-381.

Klein S, Romijn JA. Obesity. Kronenberg: Williams Textbook of endocrinology. Saunders; 2008. 11^a ed.1563-80p.

Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature.* 2000;404(6778):635-43.

Krawczyk AS, Jorge F, Haller JF, Ferrante T, Zoeller RA, Corkey BE. Reactive oxygen species facilitate translocation of hormone sensitive lipase to the lipid droplet during lipolysis in human differentiated adipocytes. *Plos One.* 2012;(7):1-9.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-5.

Lass A, Zimmermann R, Haemmerle G, Riederer M, Schoiswohl G, Schweiger M, Kienesberger P, Strauss JG, Gorkiewicz G, Zechner R. Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in chnarin-dorfman syndrome. *Cell Metab.* 2006;3(5):309-319.

Liu RH, Mizuta M, Matsukura S. The expression and functional role of nicotinic acetylcholine receptors in rat adipocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;310(1):52-8.

Londos C, Brasaemle DL, Schultz CJ. On the control of lipolysis in adipocytes. *Ann N Y Acad Sci* 1999;892:155–168.

Lonnqvist F, Thome A, Nilsell K, Hoffstedt J, & Arner P. A pathogenic role of visceral fat beta 3-adrenoceptors in obesity. *J Clin Invest.* 1995;95(3):1109-1116.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75.

Lycett D, Munafò M, Johnstone E, Murphy M, Aveyard P. Associations between weight change over 8 years and baseline body mass index in a cohort of continuing and quitting smokers. *Addiction.* 2011; 106:188–196.

Mangubat M, Lutfy K, Lee ML, Pulido L, Stout D, Davis R, Shin CS, Shahbazian M, Seasholtz S, Sinha-Hikim A, Sinha-Hikim I, O'Dell LE, Lyzlov A, Liu Y, Friedman TC. Effect of nicotine on body composition in mice. *J Endocrinol.* 2012;212(3):317-26.

Martinez-Botas J, et al., Absence of perilipina results in leanness and reverses obesity in *Lepr(db/db)* mice. *Nat Genet.* 2000;26(4):474-479.

Menegali BT, Nesi RT, Souza PS, Silva LA, Silveira PC, Valença SS, Pinho RA. The effects of physical exercise on the cigarette smoke-induced pulmonary oxidative response. *Pulm Pharmacol Ther.* 2009;22(6):567-73.

Mineur YS, Abizaid A, Rao Y, Salas R, DiLeone RJ, Gündisch D, Diano S, De Biasi M, Horvath TL, Gao XB, Picciotto MR. Nicotine decreases food intake through activation of POMC neurons. *Science.* 2011;332,1330-1332.

Miyata G, Meguid MM, Varma M, et al., Nicotine alters the usual reciprocity between meal size and meal number in female rat. *Physiol Behav* 2001;74:169-176.

Miyoshi H, Souza SC, Zhang HH, Strissel KJ, Christoffolete MA, Kovsky J, Rudich A, Kraemer FB, Bianco AC, Obin

MS, Greenberg AS. Perilipin promotes hormone-sensitive lipase-mediated adipocyte lipolysis via phosphorylation-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem.* 2006;281(23):15837-15844.

Moffatt RJ, Owens SG. Cessation from cigarette smoking: changes in body weight, body composition, resting metabolism, and energy consumption. *Metabolism.* 1991; 40:465–470.

Nielsen TS, Jessen N, Jorgensen JOL, Moller N, Lund S. Dissecting adipose tissue lipolysis: molecular regulation and implications for metabolic disease. *J. Mol End.* 2014;52, R199–R222.

Oeser A, Goffaux J, Snead W, Carlson MG. Plasma leptin concentrations and lipid profiles during nicotine abstinence. *Am J Med Sci.* 1999;318(3):152-7.

O'Hara P, Connett JE, Lee WW, Nides M, Murray R, Wise R. Early and late weight gain following smoking cessation in the Lung Health Study. *Am J Epidemiol* 1998; 148:821–830

Onat A, Uyarel H, Hergenc G, Karabulut A, Albayrak S, Can G. Determinants and definition of abdominal obesity as related to risk of diabetes, metabolic syndrome and coronary disease in Turkish men: a prospective cohort study. *Atherosclerosis* 2007;191:182-90.

Perkins KA, Epstein LH, Marks BL, Stiller RL, Jacob RG. The effect of nicotine on energy expenditure during light physical activity. *N Engl J Med* 1989; 320: 898-903.

Potter LR. Cardiac Natriuretic Peptide? *Endocrinology.* 2004;145(5):2129–2130.

Raza H, John A, Nemmar A. Short-term effects of nose-only cigarette smoke exposure on glutathione redox homeostasis, cytochrome P450 1A1/2 and respiratory enzyme activities in mice tissues. *Cell Physiol Biochem.* 2013; 31(4-5):683-92.

Roberts CK, Sindhu KK. Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sci.* 2009;84(21-22):705-12.

Schutz Y, Tremblay A, Weisier RL, Nelson KM. Role of fat oxidation in the long-term stabilisation of body weight in obese women. *Am J Clin Nutr* 1992; 55: 670–674.

Schweiger M, Schreiber R, Haemmerle G, Lass A, Fledelius C, Jacobsen P, Tornqvist H, Zechner R. Zimmermann R. Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase are the major enzymes in adipose tissue triacylglycerol catabolism. *J. Biol. Chem.* 2006; 281, 40236-40241.

Segal A, Fandino J. Indicações e contraindicações para realização das operações bariátricas. *Rev Bras Psiquiatr.* 2002;24(Supl III):68-72.

Shen WJ, Sridhar K, Bernlohr DA, & Kraemer FB () Interaction of rat hormone-sensitive lipase with adipocyte lipid-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;96(10):5528-5532.

Stralfors, P. Belfrage, P. Phosphorylation of hormone-sensitive lipase by cyclic GMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett.* 1985; 180, 280-284

Stamford BA, Matter S, Fell RD, Papanek P. Effects of smoking cessation on weight gain, metabolic rate, caloric consumption, and blood lipids. *Am. J. Clin. Nutr.* 1986;43:486-494.

Steinbrenner H, Sies H. Protection against reactive oxygen species by selenoproteins. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1790(11):1478-85.

Steinberg, G. R. Jorgensen, S. B. The AMP-activated protein kinase: role in regulation of skeletal muscle metabolism and insulin sensitivity. *Mini Rev. Med. Chem.* 2007; 7. 519-526.

Sztalryd C, Xu G, Dorward H, Tansey JT, Contreras JA, Kimmel AR, Londos C. Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation. *J Cell Bio.* 2003;161(6):1093-1103.

Talior I, Yarkoni M, Bashan N, Eldar-Finkelman H () Increased glucose uptake promotes oxidative stress and PKC-delta activation in adipocytes of obese, insulin-resistant mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003;285:E295-302.

Tansey JT, Sztalryd C, Gruia-Gray J, Roush DL, Zee JV, Gavrilova O, Reitman ML, Deng CX, Li C, Kimmel AR, Londos C. Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and resistance to diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98(11):6494-6499.

Valença, S. S., K. Da Hora, et al., Emphysema and metalloelastase expression in mouse lung induced by cigarette smoke. *Toxicol Pathol.* 2004; 32:351-6.

Villena JA, Roy S, Sarkadi-Nagy E, Kim KH, Sul HS. Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids *J Biol Chem.* 2004; 279, (45) 5, pp. 47066-47075.

Wang IH, Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by a dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radical Biology and Medicine.* 1999;27:612-616.

Watt, M. J. and Steinberg, G. R. Pathways involved in lipid-induced insulin resistance in obesity. *Future Lipidol.* 2007; 2, 659-667.

Williamson DF, Madans J, Anda RF, Kleinman JC, Giovino GA, Byers T. Smoking cessation and severity of weight gain in a national cohort. *N Engl J Med* 1991; 324:739-745.

Wolfe RR, Peters EJ, Klein S, Holland OB, Rosenblatt J, Gary H Jr. Effect of short-term fasting on lipolytic responsiveness in normal and obese human subjects. *Am J Physiol.* 1987;252: E189-196.

World Health Organization. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Obesity Technical Report Series. 1995; 854.

World Health Organization. The world health report: Reducing risks, promoting health life. 2002.

World Health Organization. Tobacco Free Initiative (TFI): World No Tobacco Day. Geneva: WHO Press. 2013.

Yamaguchi T, Omatsu N, Matsushita S, Osumi T. CGI-58 interacts with perilipina and is localized to lipid droplets. Possible involvement of CGI-58 mislocalization in Chanarin-Dorfman syndrome. *J Biol Chem*. 2004;279(29):30490-30497.

Ypsilantis P, Politou M, Anagnostopoulos C, Tsigalou C, Kambouromiti G, Kortsaris A, Simopoulos C. Effects of Cigarette Smoke Exposure and Its Cessation on Body Weight, Food Intake and Circulating Leptin, and Ghrelin Levels in the Rat. *Nicotine & Tobacco Research*. 2013;15 (1):206-212.

Zechner R, Kienesberger PC, Haemmerle G, Zimmermann R, Lass A. Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores. *J Lipid Res*. 2009 50: 3-21.

Zechner R, Zimmermann R, Eichmann TO, Kohlwein SD, Haemmerle G, Lass A, Madeo F. Fat signals-lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. *Cell Metab*. 2012;15(3):279-91.

Zeve, J. L. M., Tomaz, C. A. B. Cirurgia metabólica - cura para diabete tipo 2. *Arq Bras Cir Dig*. Artigo de Revisão 2011;24(4):312-317.

Zilberstein B, Ferreira JA, Carvalho MH, Bussons C, Silveira-Filho AS, Joaquim H, Ramos F. Operação de Scopinaro modificado na falha da banda gástrica, ABCD. *Arq Bras Cir Dig*. 2011;24(2):136-9.

Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G, Schoiswohl G, Birner-Gruenberger R, Riederer M, Lass A, Neuberger G, Eisenhaber F, Hermetter A, Zechner R. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science*. 2004;306(5700):1383-1386.

ANEXO A – Carta de Aprovação da CEUA



A Comissão de Ética no Uso de Animais, normatizada pela Resolução n. 02/2011/Câmara Propex de acordo com a Lei Federal 11.794, analisou o projeto abaixo.

Protocolo: 001/2013-2

Professor Responsável: Cláudio Teodoro de Souza.

Equipe: Ricardo Aurino de Pinho, Daniela Roxo de Souza, Schérolin de Oliveira Marques, Thais Fernandes Luciano, Alessandra Gonçalves Machado.

Título: "AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES METABÓLICAS E MOLECULARES DA EXPOSIÇÃO À FUMAÇA DE CIGARRO EM DIFERENTES TECIDOS DE CAMUNDONGOS MAGROS E OBESOS: PAPEL DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E AMPK".

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicado a CEUA. Foi autorizada a utilização de 420 Camundongo heterogêneo Swiss 30 dias 20-25g. Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos em que constam como pesquisadores. Para demais dúvidas, contatar a CEUA pelo e-mail ceua@unesc.net.

The animal research Ethics Committee, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794, has analyzed the following Project:

Protocol number: 001/2013-2

Principal Investigator: Cláudio Teodoro de Souza.

Researchers: Ricardo Aurino de Pinho, Daniela Roxo de Souza, Schérolin de Oliveira Marques, Thais Fernandes Luciano, Alessandra Gonçalves Machado.

Project title: "EVALUATION OF METABOLIC AND MOLECULAR ALTERATIONS TO CIGARETTE SMOKE ESPOSURE IN DIFFERENT TISSUES OF LEAN AND OBESE MICE: ROLE OF REACTIVE OXIGEN SPECIES AND AMPK".

The project was Approved in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on www.unesc.net/propex/ceua or by e-mail: ceua@unesc.net.

Orciânia, 06 de agosto de 2013.

Patricia Fernanda Schuck

Patricia Fernanda Schuck

Coordenadora da CEUA